

Funktion neuartiger Enzyme der mikrobiellen Häm-Biosynthese

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Dagmar Zwerschke
aus Berlin

1. Referentin oder Referent:

Prof. Dieter Jahn

2. Referentin oder Referent:

PD Gunhild Layer

eingereicht am: 25.06.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.08.2014

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Zwerschke, D., Karrie, S., Jahn, D. & Jahn, M. ***Leishmania major* Possesses a Unique HemG-type Protoporphyrinogen IX Oxidase.** Bioscience Reports (in press)

Tagungsbeiträge

Zwerschke, D., Jahn, M. & Jahn, D. **Characterisation of the protoporphyrinogen IX oxidase from the genus *Leishmania*** (Vortrag) Tetrapyrrole Discussion Group, Kent (2013).

Zwerschke, D., Jahn, M. & Jahn, D. **Characterisation of the protoporphyrinogen IX oxidase from the genus *Leishmania*** (Poster) Tetrapyrrole Discussion Group, Kent (2013).

Zwerschke, D., Jahn, M. & Jahn, D. **Characterization of the Protoporphyrinogen IX oxidase from the genus *Leishmania*** (Poster) Jahrestagung Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Bremen (2013)

Zwerschke, D., Jahn, M. & Jahn, D. **Characterization of the Protoporphyrinogen IX oxidase from the genus *Leishmania*** (Poster) Chemistry and Biology of Tetrapyrroles Gordon Research Conference, New Port (2012)

Zwerschke, D., Jahn, M. & Jahn, D. **Identification of the protoporphyrinogen IX oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*** (Poster) Jahrestagung Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Tübingen (2012)

Zwerschke, D., Jahn, M. & Jahn, D. **Identification of the oxygen-dependent protoporphyrinogen IX oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*** (Poster) Tetrapyrrole Discussion Group, Cambridge (2012)

“In theory there is no difference between theory and practice.
In practice there is.”

- Lawrence Peter „Yogi“ Berra -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Tetrapyrrole	1
1.1.1 Struktur und Funktion der Tetrapyrrole	1
1.1.2 Häm-Biosynthese	5
1.1.3 Coproporphyrinogen III Oxidase	8
1.1.3.1 Die Coproporphyrinogen III Oxidase von <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.1.4 Protoporphyrinogen IX Oxidasen	14
1.2 Die Gattung Leishmania	19
1.2.1 Die Rolle von Häm innerhalb der Gattung Leishmania	24
1.3 Ziel der Arbeit	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Geräte und Chemikalien	28
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	30
2.2.1 Bakterienstämme	30
2.2.2 Plasmide	32
2.3 Oligonukleotide	34
2.4 Medien und Medienzusätze	35
2.4.1 Medien	35
2.4.2 Medienzusätze	37
2.5 Mikrobiologische Techniken	38
2.5.1 Sterilisation	38
2.5.2 Wachstumsbedingungen	38
2.5.3 Bestimmung von Zelldichten	38
2.5.4 Erstellung von Wachstumskinetiken	38
2.5.5 Aufbewahrung von Zellen	38
2.5.6 Kultivierung von anaeroben <i>E. coli</i> Kulturen	38
2.5.7 Anaerobisierung von Puffern und Proteinlösungen	39

2.6 Molekularbiologische Methoden	39
2.6.1 Präparation genomischer DNA	39
2.6.2 Präparation von Plasmid DNA	39
2.6.3 Bestimmung der DNA Konzentration	39
2.6.4 Produktion und Transformation von chemisch kompetenten Zellen	39
2.6.5 Agarose Gel Elektrophorese	40
2.6.6 DNA Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion	41
2.6.7 Gezielte Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	42
2.6.8 Ligation von DNA	42
2.6.9 Ortsgerichtete Mutagenese des <i>L. major hemG</i> -Gens	42
2.6.10 DNA Sequenzierung	42
2.7 Proteinchemische Methoden	43
2.7.1 Rekombinante Produktion und Reinigung von <i>L. major</i> HemG	43
2.7.2 Extraktion der Proteinaggregate (modifiziert nach (Schauer <i>et al.</i> , 2003))	43
2.7.3 Renaturierung von <i>L. major</i> HemG aus Proteinaggregaten an Nickel-IDA-Sepharose	44
2.7.4 Renaturierung von <i>L. major</i> HemG aus Proteinaggregaten durch Dialyse	44
2.7.5 Herstellung zellfreier <i>L. major</i> HemG beinhaltender <i>E. coli</i> Extrakte	45
2.7.6 Reinigung von <i>B. subtilis</i> YtpQ	45
2.7.7 Affinitätschromatographische Reinigung von <i>B. subtilis</i> YtpQ mittels Nickel-IDA-Sepharose	45
2.7.8 Konzentrierung von Proteinlösungen	46
2.7.9 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	46
2.7.10 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.7.11 Bestimmung der Aktivität von <i>L. major</i> HemG	47
2.7.11.1 Herstellung des HemG Substrates, Protoporphyrinogen IX	48
2.7.11.2 Bedingungen des Aktivitätstests	49
2.7.12 Bestimmung der Aktivität von <i>B. subtilis</i> YtpQ	49
2.7.12.1 Herstellung von Coproporphyrinogen III	49
2.7.12.2 Bedingungen des Aktivitätstests	50

2.7.13	Chromatographische Porphyrinauftrennung mittels Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	50
2.7.14	Identifizierung des Flavin Kofaktors mittels HPLC	51
2.8	Bioinformatische Methoden	52
2.8.1	Datenbanksuche mit BLAST	52
2.8.2	Computer gestützter Genomvergleich	52
2.8.3	Protein Alignment mittels Strap	53
2.8.4	Vorhersage von Proteinmodellen	53
3	Ergebnisse und Diskussion	54
3.1	Charakterisierung des Phänotyps von zwei <i>hemG</i> defizienten <i>E. coli</i> Mutanten	54
3.2	Untersuchungen zur Identifikation der unbekannten PPO aus <i>P. aeruginosa</i>	57
3.2.1	Komplementationsstudien von <i>E. coli hemG</i> mit <i>Synechocystis</i> sp. <i>hemJ</i>	57
3.2.2	Komplementation von <i>E. coli hemG</i> mit <i>P. aeruginosa hemJ</i> und einer <i>P.aeruginosa</i> Genbank	60
3.2.3	Untersuchungen zur Identifikation der unbekannten PPO aus <i>P. aeruginosa</i> mittels differentielltem Genomvergleich	62
3.3	Charakterisierung von <i>Leishmania major</i> LMJF_06_1280 als Gen für eine Protoporphyrinogen IX Oxidase des HemG-Types	66
3.3.1	Komplementationstudien von <i>E. coli</i> LG285 mit <i>Leishmania major</i> LMJF_06_1280	69
3.3.2	Elektronentransfer von Protoporphyrinogen durch <i>L. major</i> HemG zur <i>E. coli</i> Fumaratreduktase	73
3.3.3	Gereinigtes <i>L. major</i> HemG hat PPO Aktivität <i>in vitro</i>	76
3.3.4	FMN ist der Kofaktor von <i>L. major</i> HemG	79
3.3.5	Identifikation von katalytisch oder strukturell bedeutenden Aminosäureresten von <i>L. major</i> HemG	81

3.4	Charakterisierung der putativen Coproporphyrinogen III Oxidase YtpQ	
	aus <i>Bacillus subtilis</i>	86
3.4.1	<i>Bacillus subtilis</i> YtpQ ist eine Coproporphyrinogen III Oxidase	88
3.4.2	Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen Metallkofaktors von YtpQ	92
4	Zusammenfassung	95
5	Ausblick	96
	<i>Tabellenverzeichnis</i>	97
	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	97
	<i>Literaturverzeichnis</i>	100
	<i>Danksagung</i>	108

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
ACAMP	apoptotic cell associated molecular pattern
ALA	5'-Aminolevulinsäure
ALAS	5'-Aminolevulinsäure Synthase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinder Serumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Cm	Chloramphenicol
CoA	Koenzym A
Copro	Coproporphyrin III
Coprogen	Coproporphyrinogen III
CPO	Coproporphyrinogen III Oxidase
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
dest.	destiliert
DHA	Docosahexanonsäure
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPA	Docosapentanonsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-Tetraessigsäure
F	Phenylalanin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FC	Ferrochelataase
FMN	Flavinmononukleotid
FRD	Fumarat Reduktase

fw	forward (vorwärts)
g	Erdbeschleunigung (Gravitation)
GluRS	Glutamyl-tRNA-Synthase
GluTR	Glutamyl-tRNA Reduktase
GSA	Glutamate-1-semialdehyd
GSAM	Glutamate-1-semialdehyd-2,1-aminomutase
h	Stunde
His	Histidin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HO	Hämoxygenase
HP	Harderoporphyrin
HPLC	Hochdruck Flüssigkeits Chromatographie
IP10	induziertes Protein 10
IFN γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	lysogeny broth
LCF	<i>Leishmania</i> chemotaktischer Faktor
m	Milli
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MQ	Menachinon
M _r	relative molekulare Masse
n	nano
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NAR	Nitrat Reduktase
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
rpm	Umdrehungen pro Minute

OD _λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
p	pico
p.a.	<i>per analysis</i>
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBGS	Porphobilinogen Synthase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMN	phagozytierende polymorphonukleare neutrophile Granulozyten
PPO	Protoporphyrinogen IX Oxidase
Proto	Protoporphyrin IX
Protogen	Protoporphyrinogen IX
Q	Chinon
rev	reverse (rückwärts)
R	Arginin
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
spp.	Spezies
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TH1-Zellen	Typ1 Thymus-Lymphozyten-Helfer-Zellen
TTC	2, 3, 5- Triphenyl-tetrazoliumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UROD	Uroporphyrinogen III Decarboxylase

UROS	Uroporphyrinogen III-Synthase
UV/Vis	Ultravioletter- und sichtbarer Bereich des Lichtes
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
Y	Tyrosin
β-ME	β-Mercaptoethanol
μ	micro
[4Fe-4S]	4 Eisen-4 Schwefel

1 Einleitung

1.1 Tetrapyrrole

Bei Tetrapyrrolen handelt es sich um komplexe Makromoleküle, welche zu den häufigsten Pigmenten in der Natur zählen (Heinemann *et al.*, 2008). Sie sind ubiquitär zu finden und spielen eine wichtige Rolle bei fundamentalen biologischen Prozessen, wie der Atmung, der Photosynthese, dem Primär- und Sekundärstoffwechsel, sowie dem Transport von Sauerstoff (Heinemann *et al.*, 2008). Aufgrund ihres konjugierten Ringsystems sind sie zumeist farbig. Deshalb werden sie auch als „Farbstoffe des Lebens“ bezeichnet (Battersby, 2000). Zu den häufigsten Vertretern der Tetrapyrrole in der Natur gehört das Chlorophyll, welches Ursache des Blattgrüns ist. Eine entscheidende Rolle spielt das Chlorophyll während der Photosynthese, wo es verantwortlich für die Lichtabsorption und Weitergabe der absorbierten Energie ist (Emerson, 1929). Durch die innovativen Arbeiten von Richard Willstätter an Chlorophyll, die unter anderem darin bestanden dieses in großen Mengen herzustellen wofür er 1915 den Chemienobelpreis erhielt (Nobelprize.org, 2013b), konnte Ian Fleming 1967 die absolute Konfiguration von Chlorophyll aufklären (Fleming, 1967). Ein anderes wichtiges und allgemein bekanntes Tetrapyrrol ist das Eisen-chelatierte Häm. Dabei handelt sich um die prosthetische Gruppe von Globinen, wie Hämoglobin und Myoglobin (Panek und O'Brian, 2002), Cytochromen und anderen Proteingruppen in vielen Lebewesen (Harbury und Loach, 1959). Häm ist der Grund weshalb das Blut der Vertebraten rot erscheint, wobei sauerstoffreiches Blut heller erscheint. Dies ist in einer Konformationsänderung begründet, bei der sich die Position des Eisens der Hämgruppe des Hämoglobins relativ zu seinen Bindungspartnern ändert. Dadurch kommt es zu einer Veränderung des Absorptionsspektrums des Häms (Perutz, 1979). 1930 erlangte Hans Fischer unter anderem für seine vollständige Synthese des Hämins, welches eine Komplexverbindung des Häms darstellt, den Nobelpreis für Chemie (Nobelprize.org, 2013a).

1.1.1 Struktur und Funktion der Tetrapyrrole

Tetrapyrrole bestehen aus den namensgebenden vier Pyrrolen, welche über Methinbrücken miteinander verbunden sind. Pyrrole sind fünfatomige Ringe, welche aus 4 Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom bestehen (Heinemann *et al.*, 2008).

Man unterscheidet im Allgemeinen lineare und zyklische Tetrapyrrole. In Abbildung 1 ist die Grundstruktur der zyklischen Tetrapyrrole, das Porphyrin, dargestellt (Heinemann *et al.*, 2008). Hierbei sind die vier Pyrrole kovalent über Methinbrücken verbunden und werden im Uhrzeigersinn mit A-D benannt. Auch die Kohlenstoff- und Stickstoffatome werden üblicherweise im Uhrzeigersinn benannt. Kohlenstoffatome mit einer Bindung zu einem Stickstoffatom sind in α -Position, wohingegen Kohlenstoffatome ohne Bindung zu einem Stickstoffatom sich in β -Position befinden. Die Kohlenstoffatome der verbindenden Methinbrücke liegen in der *meso*-Position. Mittig im Molekül befindet sich häufig ein divalentes Kation, welches über mindestens 2 Stickstoffatome chelatiert ist (Warren und Smith, 2009).

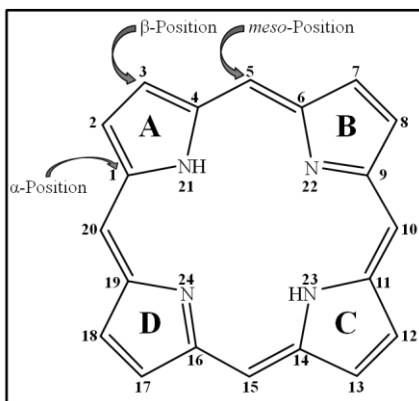


Abbildung 1: Der Porphyrinring, die Grundstruktur zyklischer Tetrapyrrole.

Die Pyrrolringe sind im Uhrzeigersinn von A bis D bezeichnet. Kohlenstoff- und Stickstoffatome sind durchnummeriert. α -Position: Kohlenstoffatome in direkter Nachbarschaft zu Stickstoffatomen; β -Position: Kohlenstoffatome ohne Bindung zu einem Stickstoffatom; *meso*-Position: Kohlenstoffatome welche die Pyrrolringe verbinden.

Zyklische Tetrapyrrole können in 2 Hauptgruppen unterteilt werden. Zum einen die Porphyrine, bei denen alle 4 Pyrrolringe mit Methinbrücken verbunden sind. Diese Gruppe kann anhand ihrer Reduzierung des Porphyrinringes in die echten Porphyrine mit unreduziertem Porphyrinring und die Chlorine, Bacteriochlorine, Isobacteriochlorine und Chorphide, sowie Häm *dI* mit reduziertem Porphyrinring unterteilt werden (Warren und Smith, 2009). Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Tetrapyrrole bei denen die 4 Pyrrolringe nur durch 3 Methinbrücken verbunden sind. Hierzu gehören die Corrinoide ((Warren und Smith, 2009), Abbildung 2).

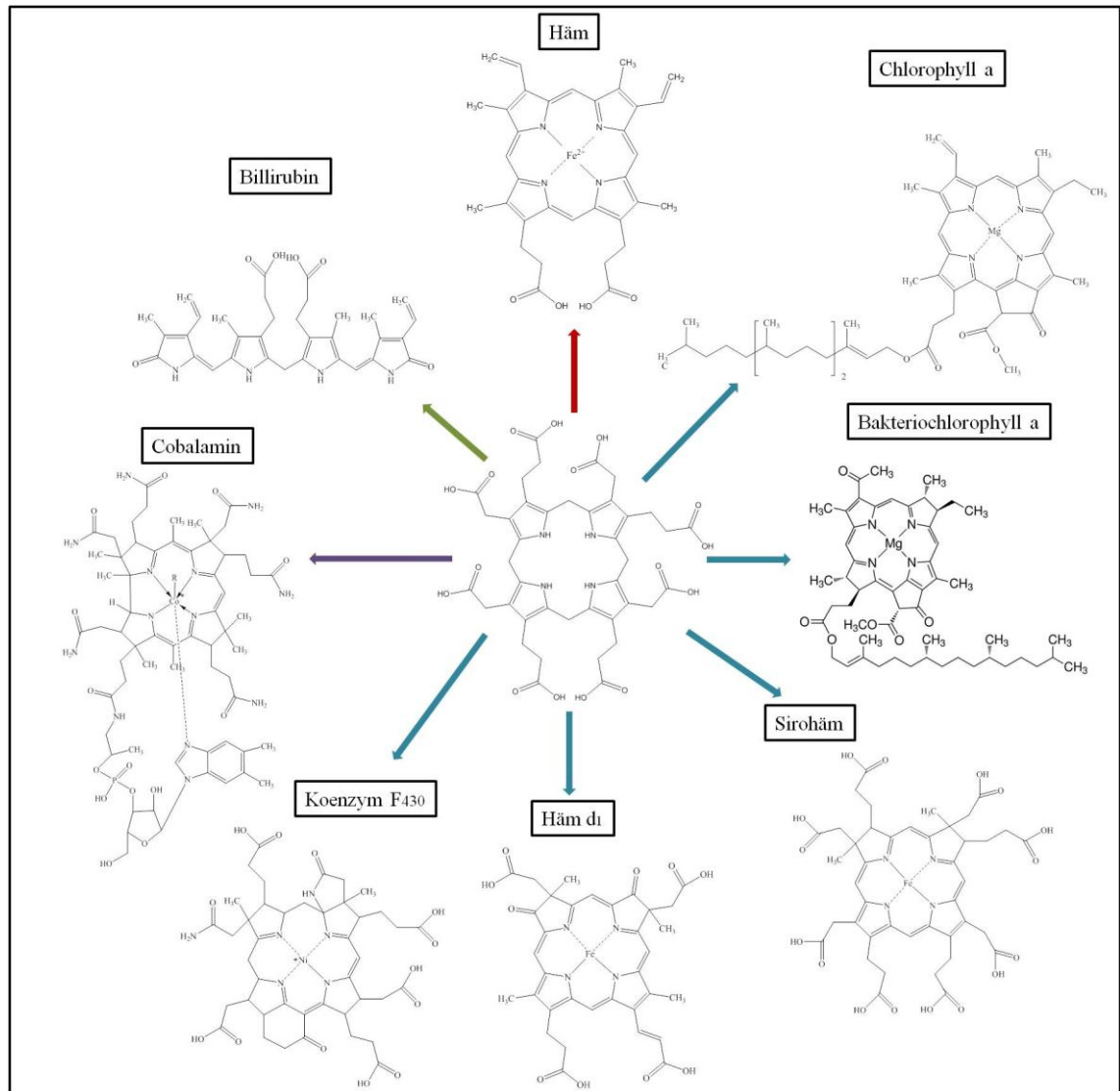


Abbildung 2: Typen der Tetrapyrrole ausgehend vom letzten gemeinsamen Vorstufenmolekül, Uroporphyrinogen III.

Wichtige Vertreter der 8 Gruppen der Tetrapyrrole sind dargestellt. blaue Pfeile: reduzierte Porphyrine; roter Pfeil: echtes Porphyrin; lila Pfeil: Corrinoid; grüner Pfeil: lineares Tetrapyrrol.

Zu den Corrinoiden, welchen die Methinbindung zwischen dem D und A Ring fehlt, gehört unter anderem das pinke Cyanocobalamin besser bekannt als Vitamin B12. Bei seinem Zentralatom handelt es sich um Kobalt, worauf auch der Name zurückzuführen ist. Es handelt sich um eines der größten in einem Labor vollständig synthetisch hergestellten Moleküle. Vitamin B12 ist an Radikal-abhängigen Nukleotidreduktionen und am Methylgruppentransfer beteiligt (Taylor und Weissbach, 1969). Das gelbe Coenzym F₄₃₀ gehört in die Gruppe der Corphine. Es zählt zu den erst kürzlich charakterisierten Tetrapyrrolen und hat interessanterweise Nickel chelatiert. Es handelt sich hierbei um die prosthetische Gruppe der Methyl-Coenzym M Reduktase, einem Enzym welches den letzten Schritt der Methanbildung in methanogenen Archaeen

katalysiert (Thauer und Bonacker, 1994). Als typisches Porphinoid mit signifikant anderer Struktur und Farbe gilt das grüne Häm d_1 . Es ist Teil der dissimilatorischen Nitritreduktase in Pseudomonaden (Chang und Wu, 1986). Die Biosynthese von Vitamin B12, Coenzym F_{430} und Häm d_1 findet sich ausschließlich in Prokaryoten (Heinemann *et al.*, 2008). Sirohäm, ein gelblich grünes Isobakteriochlorin mit Eisen als divalentem Kation, ist maßgeblich am Transfer der sechs Elektronen während der assimilatorischen Nitrit bzw. Sulfit Reduktion beteiligt (Vega und Garrett, 1975). Der wohl bekannteste Vertreter der Chlorine ist das grüne Chlorophyll a. Dieses besitzt genau wie das Bakteriochlorin Bakteriochlorophyll Magnesium als chelatiertes Zentralatom. Beiden obliegt die Aufgabe als Photorezeptor bei der Photosynthese. Sie gelten als die Schlüsselpigmente für das Absorbieren von Sonnenlicht und konvertieren dieses zu chemischer Energie (Vredenberg *et al.*, 1965). Ein anderer weithin bekannter Vertreter der Porphyrine ist das rote echte Porphyrin Häm. Als prosthetische Gruppe von Proteinen, z.B. Peroxidasen, Katalasen und Cytochrom P_{450} Enzymen, ist es durch seine Fähigkeit Elektronen zu leiten an verschiedenen Redoxreaktionen beteiligt (Layer *et al.*, 2010b). Aufgrund der gleichen Eigenschaften ist es auch in Signalwegen Sensor von zweiatomigen Gasen wie Sauerstoff, Kohlenstoffmonoxid und Stickstoffmonoxid (Rodgers, 1999). Interessanterweise wird in *Pseudomonas aeruginosa* das meiste Häm unter anaeroben denitrifizierenden Bedingungen gebildet (Schobert und Jahn, 2002). Zudem dient exogenes Häm vielen Pathogenen als Eisenquelle innerhalb der Wirtszellen. Häm besitzt desweiteren eine regulatorische Rolle innerhalb der Zelle. So nimmt es Einfluss auf die Proteinexpression auf transkriptionaler und translationaler Ebene sowie auf die Zelldifferenzierung (Heinemann *et al.*, 2008).

Nicht zyklische oder lineare Tetrapyrrole entstehen aus zyklischen Tetrapyrrolen und weisen aufgrund dessen nur 3 Methinbrücken auf. Auch die Ringe der linearen Tetrapyrrole werden mit A-D bezeichnet. Sie können in 3 Gruppen aufgeteilt werden: Gallenfarbstoffe, Chlorophyllabbau Produkte und Phycobiline (Warren und Smith, 2009). Biline fungieren als Kofaktoren von Proteinen innerhalb von Lichtsammelkomplexen bzw. Photorezeptoren in phototrophen Organismen (Dammeyer und Frankenberg-Dinkel, 2008). Micromatabilin ist verantwortlich für die grüne Farbe der Spinne *Micrommata virescens* (Holl und Rüdiger, 1975). Zudem werden linearen Tetrapyrrolen antioxidantische Wirkungen zugeschrieben (Franklin *et al.*, 2009).

1.1.2 Häm-Biosynthese

Die Häm-Biosynthese startet mit der Generierung der 5'-Aminolevulinsäure (ALA) (Abb.3). Es handelt sich hierbei um die einzige Quelle der Kohlenstoff- und Stickstoffatome, welche für das Grundgerüst der Tetrapyrrole benötigt werden. Derzeit sind 2 Wege bekannt ALA zu synthetisieren, der Shemin-Weg und der C₅-Weg (Heinemann *et al.*, 2008).

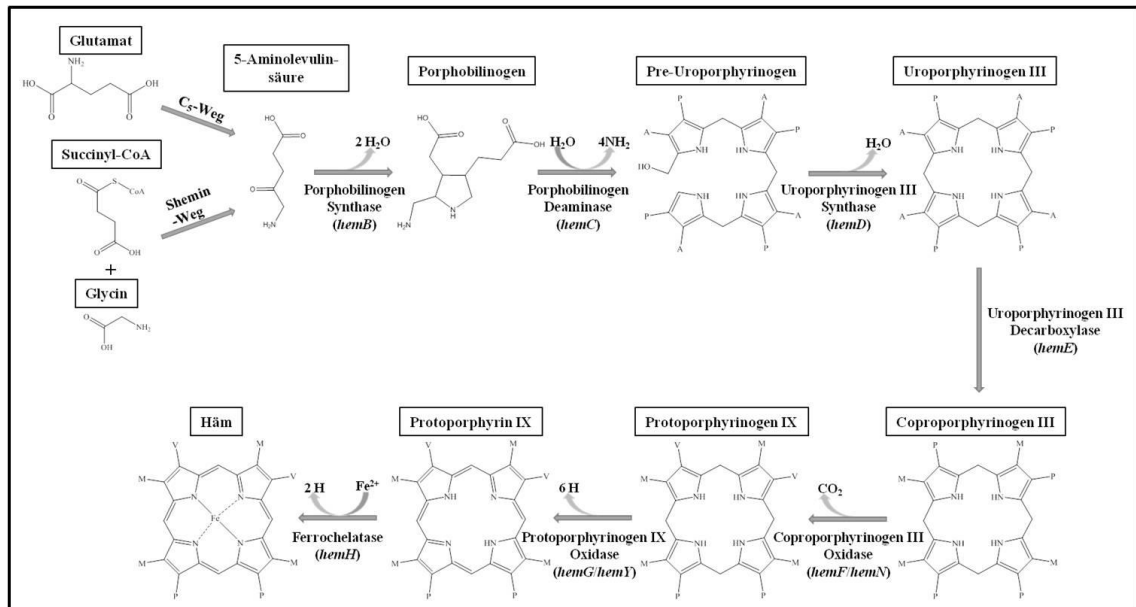


Abbildung 3: Die Häm-Biosynthese.

Namen der katalysierenden Enzyme sind unterhalb der Pfeile dargestellt, korrespondierende Gene in Klammern darunter. A: Acetat-Seitenkette; M: Methyl-Seitenkette; P: Propionat-Seitenkette; V: Vinyl-Seitenkette.

Der Shemin-Weg (Abbildung 3) benannt nach einem seiner Entdecker basiert auf der Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin bei gleichzeitiger Elimination von CO₂. Diese Route wird von nicht photosynthetischen Eukarya und alpha-Proteobakteria genutzt. Hierbei katalysiert das Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) abhängige Enzym 5'-Aminolevulinsäure Synthase (ALAS; EC 2.3.1.37) die Reaktion. ALAS wird durch *hemA* codiert und gehört zu der α -Oxoamin Synthase Untergruppe der PLP- abhängigen Enzyme. Es weist eine geordnete *bi-bi* Kinetik auf, bei der erst Glycin und dann Succinyl-CoA rekrutiert werden und nach Bindung, ALA erst nach CO₂ und CoA dissoziiert (Kaufholz *et al.*, 2013).

Der C₅-Weg (Abbildung 3) startet ausgehend vom C₅-Skelett des Glutamats, woher er auch seinen Namen hat. Er ist in vielen Bakterien sowie in allen Archaeen und Pflanzen vertreten. Das initiale Substrat dieses Weges ist die glutamyl-tRNA. Dieses wird

zunächst in einem ATP abhängigen Schritt gebildet, bei welchem die tRNA^{Glu} mit Glutamat beladen wird wodurch die glutamyl-tRNA^{Glu} entsteht. Diese Reaktion wird durch die Glutamyl-tRNA Synthase (GluRS) katalysiert und sowohl für die Protein als auch die Häm Synthese genutzt. Das erste allein für die Häm Synthese zuständige Enzym des C₅-Weges ist die die Glutamyl-tRNA Reduktase (GluTR; EC 6.1.1.17), welche je nach Organismus durch *hema* bzw. *gltR* codiert ist. In einer NADPH abhängigen Reaktion katalysiert GluTR die Reduktion der glutamyl-tRNA zum instabilen Glutamate-1-semialdehyd (GSA) (Moser *et al.*, 2001). In einem weiteren Schritt wird dieses durch die Glutamate-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSAM; EC 5.4.3.8) in einer PLP abhängigen Aminomutase Reaktion zu ALA umgewandelt. GSAM wird durch *hemL* codiert (Ilag *et al.*, 1991).

Euglena gracilis ist der bisher einzige bekannte Organismus der beide Wege benutzt. Wobei dieser photosynthetische Phytoflagellat den Shemin-Weg für mitochondriales Häm und den C₅-Weg für Plastid-Pigmente verwendet (Heinemann *et al.*, 2008).

Im nächsten Schritt der Häm-Biosynthese wird aus 2 Molekülen ALA Porphobilinogen asymmetrisch kondensiert (Abbildung 3). Das Enzym welches diese Reaktion katalysiert ist die Porphobilinogen Synthase (PBGs; EC 4.2.1.24), welche durch *hemB* codiert wird (Frere *et al.*, 2002).

Die Porphobilinogen Deaminase (PBGD; EC 4.3.1.8) katalysiert die Reaktion von 4 Porphobilinogenen zu 1-Hydroxymethylbilan auch bekannt als Pre-Uroporphyrinogen (Abbildung 3). Das *hemC* Gen codiert für PBGD. Interessanterweise dient in diesem Schritt Porphobilinogen nicht nur als Substrat sondern auch als Kofaktor für PBGD. Hierbei wird aus 2 Porphobilinogen der Kofaktor Dipyrrromethan synthetisiert, welcher ausschließlich in der PBGD vorkommt. Die freie *alpha*-Position des Cofaktors dient als Anknüpfungspunkt der Oligomerisierung von Porphobilinogen, wobei ein Hexapyrrol gebildet wird und es zur Freigabe des linearen Tetrapyrrols Pre-Uroporphyrinogen kommt. Der Kofaktor Dipyrrromethan bleibt im Enzym gebunden (Warren und Jordan, 1988).

Pre-Uroporphyrinogen wird direkt an die Uroporphyrinogen III-Synthase (UROS; EC 4.2.1.75), codiert durch *hemD*, weitergeleitet (Abbildung 3). Diese katalysiert die Konversion von Pre-Uroporphyrinogen zu Uroporphyrinogen III. Hierbei kommt es zur

Inversion von Ring D über einen *Spiro*-Mechanismus wobei das Intermediat Spiropyrrolenin entsteht (Stamford *et al.*, 1995). Uroporphyrinogen III ist das einzige asymmetrische Isomer der 4 möglichen Uroporphyrinogen Isomere. Es handelt sich zudem um das erste zyklische Intermediat des Stoffwechselweges und ist somit Basis aller Tetrapyrrole, sowie die Verzweigungsstelle zwischen den Porphyrinen und den Porphinoiden. In Organismen bei denen die UROS defekt ist oder nicht synthetisiert wird, reagiert Pre-Uroporphyrinogen zum toxischen Uroporphyrinogen I. Dieses entsteht durch die autokatalytische Verbindung von Ring A mit Ring D ohne vorherige Inversion des Ringes D. Uroporphyrinogen I kann zu dem ebenfalls toxischen Coproporphyrinogen I umgesetzt werden. Beide Moleküle häufen sich als toxische Abfallprodukte an (Heinemann *et al.*, 2008).

Das nächste Enzym der Häm-Biosynthese ist die Uroporphyrinogen III Decarboxylase (UROD; EC 4.1.1.37), welches, von *hemE* codiert wird. UROD katalysiert die sequenzielle Decarboxylierung der vier Acetatreste von Uroporphyrinogen III zu den entsprechenden Methylgruppen und generiert somit Coproporphyrinogen III (Abbildung 3). Die Decarboxylierung verläuft geordnet und startet an Ring D auf den Ring A, Ring B und Ring C folgen. UROD besitzt keine Cofaktoren (Luo und Lim, 1993).

Coproporphyrinogen III wird durch die Coproporphyrinogen III Oxidase (CPO; EC 1.3.3.3) zu Protoporphyrinogen IX umgewandelt (Abbildung 3). Hierbei werden die Propionat-Seitenketten von Ring A und B oxidativ decarboxyliert zu Vinylgruppen. Derzeit sind 2 Gene bekannt die für verschiedene Coproporphyrinogen III Oxidasen codieren, zum einen *hemF* welches für eine Sauerstoff-abhängige CPO codiert, zum anderen *hemN* welche für eine Sauerstoff-unabhängige CPO codiert (Breckau *et al.*, 2003; Layer *et al.*, 2004; Parish *et al.*, 2005). Auf die Unterschiede der einzelnen CPO wird in Kapitel 1.1.3 genauer eingegangen.

Der vorletzte Schritt der Häm Biosynthese ist die Oxidation von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX durch die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO; EC 1.3.3.4) (Abbildung 3). Hierbei kommt es durch die Eliminierung von sechs Elektronen zur vollständigen Konjugation des Ringsystems (Poulson und Polglase, 1975). Wie bei der CPO, gibt es auch für die PPO verschiedene Gene, die für sie codieren. *HemY* codiert

für eine Sauerstoff-abhängige PPO, wohingegen *hemG* für eine Sauerstoff-unabhängige PPO codiert (Dailey und Karr, 1987; Möbius *et al.*, 2010). In Kapitel 1.1.4 wird genauer auf die Unterschiede der Protoporphyrinogen IX Oxidasen eingegangen.

Die Ferrochelatase (FC; EC 4.99.1.1) stellt das letzte Enzym der Häm Biosynthese dar. Sie wird durch *hemH* codiert. Die Ferrochelatase katalysiert eine Insertion von divalentem Eisen in Protoporphyrin IX wodurch Häm *b* entsteht (Abbildung 3). Dieses wird zum Teil noch weiter prozessiert zu Häm *a* oder Häm *c* (Porra und Jones, 1963).

1.1.3 Coproporphyrinogen III Oxidase

Die Coproporphyrinogen III Oxidase (CPO; EC 1.3.3.3) ist das fünfte Enzym der Häm Biosynthese und katalysiert die oxidative Decarboxylierung der Propionatgruppen an Ring A und B zu Vinylgruppen. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer antiplanaren Eliminierung, gepaart mit der Abstraktion des *si*-Wasserstoffs in β -Position zur Propionatgruppe in Form eines Hydrids. Die Freisetzung des Hydrids zeigt die Notwendigkeit eines Elektronenakzeptors (Breckau *et al.*, 2003). Zudem ist bekannt, dass erst die Propionatgruppe an Ring A zur Vinylgruppe umgesetzt wird und danach erst die Propionatgruppe von Ring B. Hierbei entsteht das isolierbare Zwischenprodukt Harderoporphyrinogen (Jackson *et al.*, 1980) (Abbildung 4). Es sind derzeit 2 verschiedene Gene, welche für eine CPO codieren bekannt. Hierbei codiert *hemF* für eine Sauerstoff-abhängige und *hemN* für eine Sauerstoff-unabhängige CPO (Breckau *et al.*, 2003; Parish *et al.*, 2005).

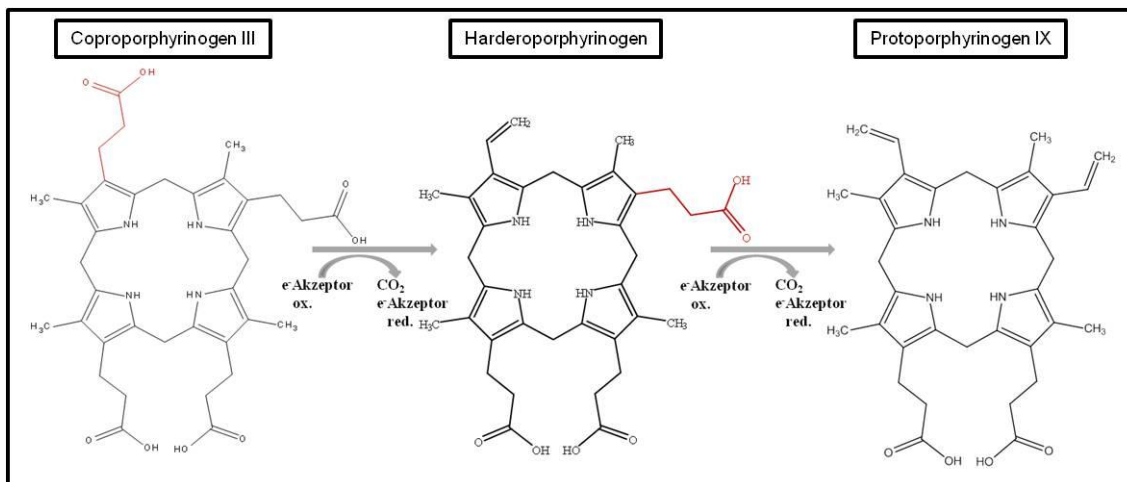


Abbildung 4: 2-stufige Reaktion der Coproporphyrinogen III Oxidase.

Rot: Propionat-Seitenketten, welche bei der Reaktion zu Vinyl-Seitenketten decarboxyliert werden.

HemF ist in Eukarya sowie in Cyanobacteria und in Unterklassen der Proteobacteria annotiert. Es ist in Säugern häufig mit der inneren Seite der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert (Layer *et al.*, 2010b). Zudem weist HemF eine ungewöhnlich hohe Aminosäuresequenzhomologie von 70 - 90 % im Vergleich der Arten auf (Heinemann *et al.*, 2008). Die gelösten Kristallstrukturen des HemF vom Menschen und der Hefe weisen weder Cofaktoren noch Metallionen auf (Phillips *et al.*, 2004). Dies ist untypisch, da Sauerstoff-abhängige Enzyme meist Metallionen für ihre Reaktivität brauchen (Widboom *et al.*, 2007). Dafür spricht, dass für *E. coli* HemF eine Stimulation durch Mangan gezeigt werden konnte (Breckau *et al.*, 2003). Zudem wurde im HemF der Maus Kupfer nachgewiesen (Kohno *et al.*, 1996). Die Kristallstrukturen haben eine interessante tertiäre Topologie, hierin wird ein langes 7 strängiges β -Faltblatt von α -Helices flankiert. HemF fungiert als Homodimer, wobei es eine 40° Rotation von einem Monomer zum anderen gibt (Abbildung 5). Die katalytisch aktive Tasche ist von konservierten Aminosäuren umgeben (Phillips *et al.*, 2004). Durch Aminosäuremodifikationen ist ersichtlich, dass Tyrosinreste an der Katalyse beteiligt sind (Phillips *et al.*, 2004). Aus Mutagenese Studien von HemF der Maus ist bekannt, dass das hochkonservierte His 158 wichtig für die Reaktivität des Enzyms ist (Kohno *et al.*, 1996).

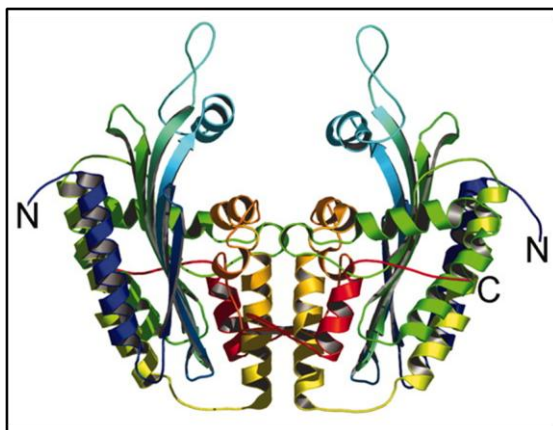


Abbildung 5: Kristallstruktur der Coproporphyrinogen III Oxidase HemF von *Saccharomyces cerevisiae*.

Bändermodell der seitlichen Ansicht von HemF entlang der doppelten vertikalen Achse. Es handelt sich um ein homodimeres Enzym (Phillips *et al.*, 2004).

Obwohl die Struktur des Enzyms geklärt ist, ist nur wenig über den genauen Reaktionsmechanismus bekannt. Zurzeit wird ein Mechanismus diskutiert, bei welchem zunächst, katalysiert durch einen basischen Aminosäurerest der CPO, die NH-Gruppe des Pyrrols deprotoniert wird. Hierbei entsteht ein Azacyclopentadienyl Anion. Dieses

Anion reagiert anschließend mit Sauerstoff an der α -Position wodurch ein Pyrrol Peroxid Anion gebildet wird. Das Proton an der β -Position der Substrat-Seitenkette wird im Folgenden durch ein Peroxid abstrahiert, welches in einer exozyklischen Doppelbindung resultiert. Die finale Eliminierung von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoffperoxid zusammen mit einer Bindungsverschiebung führt zur Bildung einer Vinyl-Seitenkette ((Layer *et al.*, 2010a), Abbildung 6).

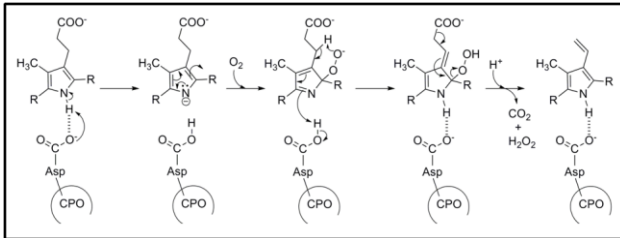


Abbildung 6: Möglicher Reaktionsmechanismus der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase.
Modifiziert nach (Layer *et al.*, 2010a)

Unter anaeroben Bedingungen wird in vielen Bakterien die Sauerstoff-unabhängige CPO HemN prozessiert. Die Kristallstruktur von HemN weist es als monomeres zweidomänen-Protein aus (Layer *et al.*, 2003). N-terminal liegt hierbei die katalytische Domäne, welche sich durch ein gebogenes 12-strängiges β -Faltblatt umgeben von α -Helices als äußere Hülle auszeichnet. Den Kern dieser Struktur bildet ein unvollständiges TIM-Barrel mit nur sechs β/α Wiederholungen anstelle der sonst typischen acht. Desweiteren befindet sich N-terminal ein 4 Eisen 4 Schwefel Zentrum ([4Fe-4S]) sowie zwei S-Adenosyl-methionine (SAM) (Layer *et al.*, 2003) (Abbildung 7).

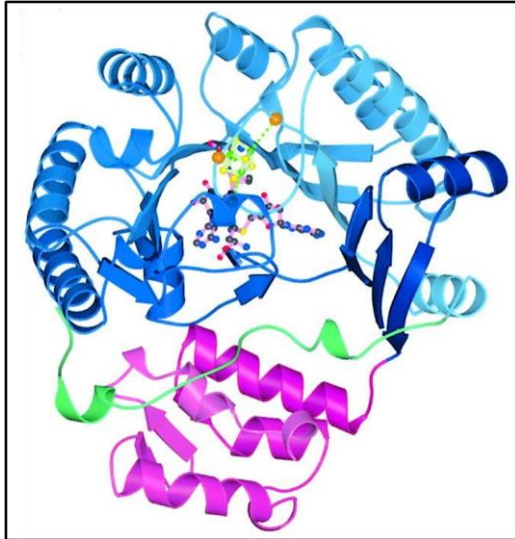


Abbildung 7: Kristallstruktur der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase HemN von *Escherichia coli*.

Blau: katalytische Domäne; Pink: Deckel; Grün: verlängerte N-terminale Region (trip-wire). Mittig: [4Fe-4S]-Zentrum und 2 SAM-Moleküle. (Layer *et al.*, 2003).

Das [4Fe-4S] Zentrum wird über 3 Cysteine in einem CXXCXXC-Motiv koordiniert. Desweiteren koordiniert ein SAM ein Eisen des [4Fe-4S] Zentrums über ein Stickstoff- und ein Sauerstoffatom des Methionins (Layer *et al.*, 2003). Diese Interaktion ist die Basis des Elektronentransfers vom [4Fe-4S] Zentrums auf SAM während der Reaktion. Aufgrund des Eisen-Schwefel Zentrums ist HemN sauerstofflabil (Layer *et al.*, 2002). Da HemN SAM während der Reaktion nutzt gehört es zur Klasse der Radikal-SAM Proteine (Kozarich, 1988). Diese Klasse nutzt Eisen-Schwefel Zentren um Elektronen von einem Elektronendonator wie zum Beispiel Ferredoxin zu SAM zu transferieren (Layer *et al.*, 2004). Dadurch wird SAM homolytisch gespalten und es entsteht ein katalytisch aktives Adenosyl-Radikal. Das 5'-Deoxyadenosyl-Radikal kann nun das Wasserstoffatom in *si*-Position vom β -Kohlenstoffatom der Propionatseitenkette des Coproporphyrinogens abstrahieren. Das hierdurch entstehende Substratradikal führt zu einer Decarboxylierung der Propionatseitenkette, wodurch Kohlenstoffdioxid frei und die Vinylgruppe gebildet wird (Abbildung 8).

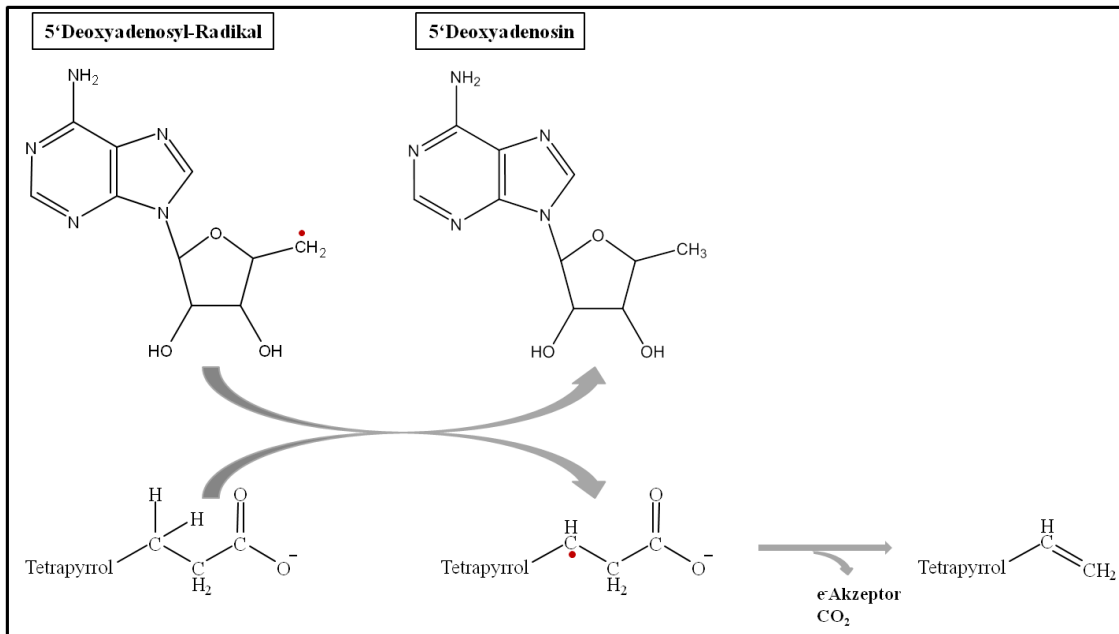


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase.

(modifiziert nach (Layer *et al.*, 2005)).

Für die vollständige Reaktion von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX werden zwei Moleküle SAM benötigt. Der ebenfalls benötigte Elektronenakzeptor ist bis heute nicht bekannt, jedoch wird für die Reaktion des weiteren NAD(P)H benötigt (Layer *et al.*, 2005).

1.1.3.1 Die Coproporphyrinogen III Oxidase von *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ist ein ubiquitär verbreiteter, Gram positiver, stäbchenförmiger Endosporenbildner der Gattung *Bacillus*. Er gilt als Aerobier, jedoch haben neuere Forschungen den Beweis einer zusätzlichen anaeroben Lebensweise hervorgebracht. *B. subtilis* gilt als das am besten untersuchte Gram positive Bakterium und ist vor allem aufgrund der Sekretion von extrazellulären Proteinen für die Industrie, sowie aufgrund seiner phylogentischen Verwandtschaft zu diversen Pathogenen, wie zum Beispiel *B. anthracis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* für die klinische Forschung von entscheidender Bedeutung. In den 1970er Jahren wurden Studien zur Häm-Biosynthese von *B. subtilis* durchgeführt, welche einen vollständigen Syntheseweg analog zu *E. coli* nahelegen (Berek *et al.*, 1975; Miczak *et al.*, 1976). In Experimenten zu den Genen der *B. subtilis* Häm-Biosynthese in den 1990er Jahren kamen jedoch Zweifel auf, da nicht alle *E. coli* analogen Gene ausgemacht werden konnten (Hansson und Hederstedt, 1994; Hansson *et al.*, 1991). Es wurde festgestellt,

dass sich die ersten Gene der Synthese welche für die Umsetzung von 5-Aminolevulinsäure zu Uroporphyrinogen III verantwortlich sind in dem Gencluster *hemAXCDBL* bei 244° der genetischen Karte von *B. subtilis* befinden. Ein zweites Gencluster (*hemEHY*), welches die *downstream* von UROD gelegenen Gene umfasst befindet sich bei 94° der genetischen Karte von *B. subtilis* (Hansson und Hederstedt, 1992; Hansson *et al.*, 1991). Hierbei wurde *hemY* 1994 als Protoporphyrinogen IX Oxidase identifiziert, welche auch Coprogen zu Copro umsetzen kann (Hansson und Hederstedt, 1994). Jedoch konnten die Analysen keine Aussage über eine mögliche CPO treffen, bei welcher Coprogen zu Protogen umgesetzt wird. Es wurde vermutet, dass eventuell Häm ausgehend von Copro synthetisiert wird, sodass zunächst Copro mit Eisen chelatiert wird, wodurch Eisen-Copro entsteht, welches dann weiter durch eine Eisen-Copro Decarboxylase zu Häm umgesetzt wird. Als möglicher Kandidat für die Eisen-Copro Decarboxylase wird derzeit HemQ angenommen (Dailey *et al.*, 2010). In Archeen und *Desulfovibrio* spp. ist eine solche Umwandlung von Eisen-Copro zu Häm bereits bekannt, wobei in diesem Fall jedoch das Eisen-Copro ausgehend von Uro in fünf Schritten über Preccorin-2 und Sirohäm synthetisiert wird (Kühner *et al.*, 2014; Lobo *et al.*, 2014). Nichtsdestotrotz wurde Ende der 1990er Jahre ein als *hemN* annotiertes Gen in *B. subtilis* gefunden, welches eine *hemN/hemF*-Mutante von *Salmonella typhimurium* komplementierte (Hippler *et al.*, 1997). Es konnte desweiteren gezeigt werden, dass eine *hemN*-Mutante in *B. subtilis* zur Akkumulation von Copro führt. Kurz darauf wurde ein zweites Gen gefunden, welches ebenfalls eine CPO-Mutante von *S. typhimurium* komplementiert und dessen Mutation zur Akkumulation von Copro in *B. subtilis* führt, welches *hemZ* genannt wurde. Es war jedoch nicht möglich, eine CPO Aktivität von HemN oder HemZ *in vitro* nachzuweisen (Homuth *et al.*, 1999).

1.1.4 Protoporphyrinogen IX Oxidasen

Der vorletzte Schritt der Häm-Biosynthese ist die Aromatisierung von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX, katalysiert durch die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO; EC 1.3.3.4, (Poulson und Polglase, 1975)). Bei dieser Reaktion werden zwei der insgesamt vier Iminogruppen sowie die vier Brückenkohlenstoffe C5, C10, C15 und C20 oxidiert (Abbildung 3) (Poulson und Polglase, 1975). Dadurch entstehen drei Doppelbindungen und sechs Protonen werden abgespalten. Es resultiert ein voll konjugierter, planarer, farbiger Makrozyklus, das Protoporphyrin IX (Poulson und Polglase, 1975). Wenn PPO inhibiert ist wird Protoporphyrinogen IX in das Cytosol abgegeben. Hier wird es zu Protoporphyrin IX autooxidiert. Da eine Weitergabe von Protoporphyrin IX zur Ferrochelatase ohne PPO nicht effektiv erfolgt, akkumuliert es dort. Aufgrund seines voll konjugierten π -Elektronensystems kann Protoporphyrin IX unter Lichteinfluss reaktive Sauerstoffspezies bilden, welche die Zelle schädigen oder sogar zu ihrem Tod führen können (Diez *et al.*, 2009).

Zur Zeit sind zwei Gene die für eine Protoporphyrinogen IX Oxidase codieren bekannt, *hemY* und *hemG* (Heinemann *et al.*, 2008). Hierbei codiert *hemY* für die Sauerstoff-abhängige PPO HemY. Sie kommt vor allem in Eukaryoten und Gram-positiven Bakterien vor, wird aber auch in anderen Bakterien wie Myxococcales gefunden (Dailey und Dailey, 1996a; Dailey und Dailey, 1996b). Sie wurde zuerst in Hefe sowie Säugerlebern charakterisiert (Dailey und Karr, 1987; Poulson und Polglase, 1975). HemY gehört zu der FAD Proteinsuperfamilie wie auch Monoaminoxidase und Phytoendesaturase (Poulson, 1976) und weist das dieser Familie typische Flavin Kofaktor Bindemotiv auf (Koch *et al.*, 2004). Die tertiäre Struktur variiert je nach Organismus zwischen löslichem Monomer (*Bacillus subtilis*), Membran assoziierten Monomer (*Bos sp.*) oder Homodimer (*Myxococcus xanthus*, *Nicotiana tabacum*) (Dailey und Dailey, 1996a; Koch *et al.*, 2004)(Corradi *et al.*, 2006). Das Homodimer weist pro Monomer je eine FAD-, eine Substrat- und eine Membranbindedomäne auf (Koch *et al.*, 2004) (Abbildung 9).

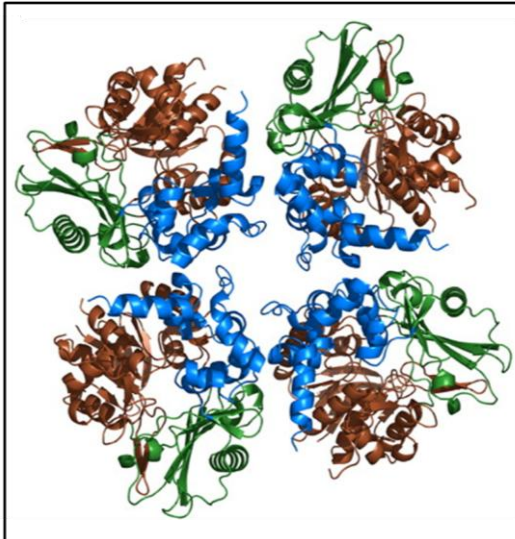


Abbildung 9: Kristallstruktur der sauerstoffabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase HemY aus *Myxococcus xanthus*.

HemY von *Myxococcus xanthus* ist ein Homotetramer. Blau: Membranbindedomäne; Grün: Substratbindedomäne; Braun: FAD-Bindedomäne (Corradi *et al.*, 2006).

Die molekulare Masse der HemY Monomere liegt zwischen $M_r = 36.000$ (*Hordeum vulgare*, (Jacobs und Jacobs, 1987)) und $M_r = 65.000$ (*Bos primigenius taurus*, (Dailey und Karr, 1987)). Die Aminosäuresequenzhomologie von verschiedenen HemY ist relativ gering, jedoch ist das Flavinbindemotiv stark konserviert zwischen allen Arten (Lermontova *et al.*, 1997). Interessanterweise besitzen höhere Pflanzen zwei verschiedene Isoformen von HemY, die plastidäre PPOI und die mitochondriale PPOII. In *N. tabacum* gibt es zwischen beiden Formen nur eine 27 %-ige Aminosäuresequenzhomologie. Dies legt nahe, dass beide PPOs unterschiedliche Ursprünge haben. Die eukaryotischen HemY befinden sich meist assoziiert an die innere Membran der Mitochondrien mit der aktiven Seite ins Zytosol ragend (Ferreira *et al.*, 1988). Bei der Reaktion von HemY dient Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Hierbei werden pro Mol Substrat 3 Mol molekularer Sauerstoff zu 3 Mol Wasserstoffperoxid umgesetzt (Koch *et al.*, 2004). Aufgrund der gelösten Kristallstrukturen von HemY und Überlagerung mit der humanen Ferrochelatase wurde ein Substratchanneling angenommen. Hierbei würde während der Interaktion der PPO mit der FC Protoporphyrin IX direkt zur Ferrochelatase gereicht werden. Dies konnte für die PPO und FC von *Thermosynechococcus elongatus* nachgewiesen werden ((Masoumi *et al.*, 2008), Abbildung 10). Eine Beteiligung der CPO bei diesem Channeling wurde diskutiert.

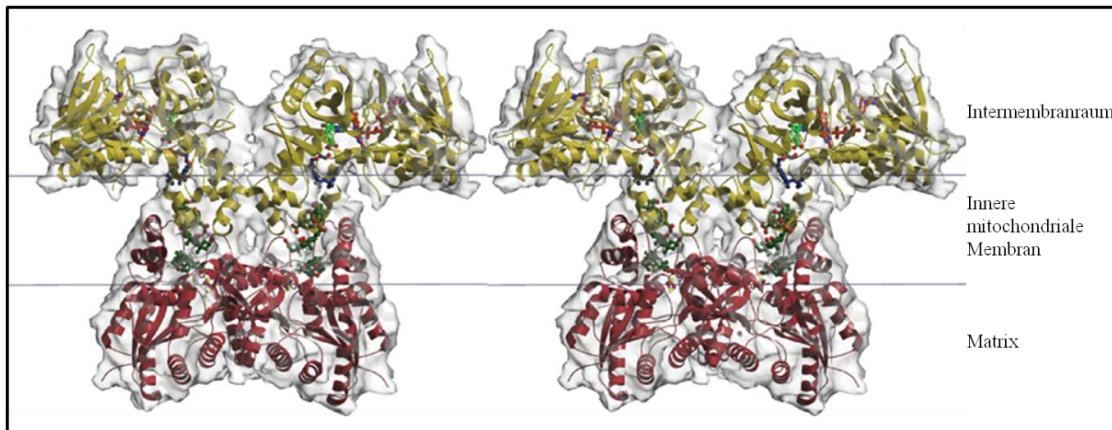


Abbildung 10: Schema des Substratchannelings der Protoporphyrinogen IX Oxidase zur Ferrochelatase.

Gelb: PPO von *Nicotiana tabacum*; Rot: humane Ferrochelatase; Grün: PPO Inhibitor 4-Bromo-3-(5'-carboxy-4'-chloro-2'-fluoro-phenyl)-1-methyl-5-trifluoromethyl-pyrazol; Rot/Orange: FAD im Substratkanal; Blau: Triton X-100; Olivgrün: Cholat-Moleküle (Koch *et al.*, 2004).

Diphenylether wie Acifluorfen inhibieren HemY, da sie die Substratbindestelle blockieren (Corradi *et al.*, 2006). Auch für das Häm Abbauprodukt Bilirubin konnte ein inhibitorischer Effekt auf HemY in der Maus gezeigt werden (Ferreira *et al.*, 1988).

Da HemY Sauerstoff-abhängig ist, ist diese PPO in anaeroben oder fakultativ anaeroben Organismen inaktiv. Da es in diesen Organismen jedoch auch eine vollständige Häm-Biosynthese gibt wurde geschlussfolgert, dass es eine weitere PPO geben muss (Klemm und Barton, 1987). Erste Hinweise auf diese lieferten Jacobs und Jacobs (Jacobs und Jacobs, 1975) in dem sie eine PPO Aktivität in *E. coli* Extrakten nachwiesen. Sie zeigten, dass die *E. coli* PPO membranassoziiert vorliegt und mit der Zellatmung zusammenhängt. Desweiteren konnte eine stärkere Aktivität nachgewiesen werden, wenn Elektronenendakzeptoren wie Fumarat oder Nitrat zugegen waren (Jacobs und Jacobs, 1975). 1979 gelang es dann Säsärman und Kollegen eine Mutante von *E. coli* K12 *Hfr Cavalli* zu isolieren, welche eine spontane Häm-Auxotrophie aufwies (Sasarman *et al.*, 1979). Die Mutante zeichnete sich durch einen langsamen Wuchs und Zwergkolonien aus, sowie durch eine rote Fluoreszenz in ultraviolettem Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Diese Fluoreszenz deutet auf eine Akkumulation von Porphyrinen hin, welche in Form von Uroporphyrin III, Coproporphyrin III und Protoporphyrin IX isoliert werden konnten (Sasarman *et al.*, 1979). Diese Beobachtungen zusammen mit einer nachgewiesenen aktiven Ferrochelatase deuten auf eine defekte PPO hin, welche zurückgeführt werden konnte auf eine Mutation des Genes *hemG*. Dieses Gen befindet sich nah an *chlB* bei ca. 85 Minuten auf der chromosomalen Karte von *E. coli* K12 (Sasarman *et al.*, 1979). HemG hat eine molekulare Masse von ca. $M_r = 21.000$ und

gehört zur Proteinfamilie der langkettigen Flavodoxine (Boynton *et al.*, 2009). Hierbei handelt es sich um kleine, am Elektronentransfer beteiligte Proteine, welche FMN als Cofaktor enthalten (Vetter und Knappe, 1971).

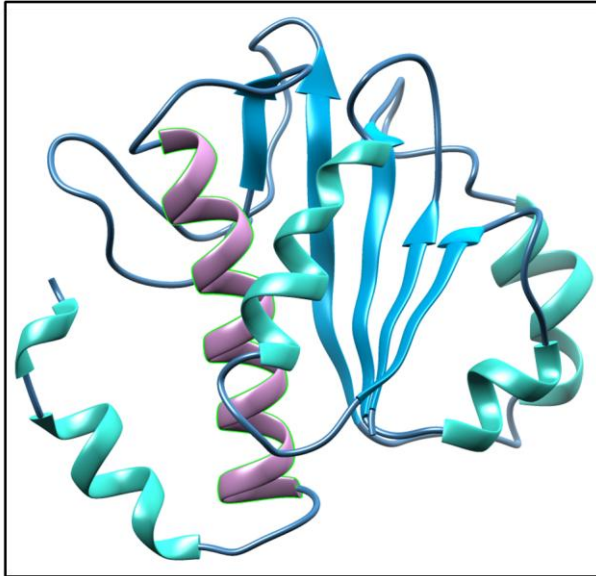


Abbildung 11: Proteinmodell der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase HemG von *Escherichia coli*.

Rosa: langkettige Insertion innerhalb des 5. β -Faltblattstranges, welche als katalytisch aktive Region postuliert ist (modifiziert nach (Möbius *et al.*, 2010)).

Das Model von HemG zeigt eine zusätzliche langkettige Insertion innerhalb des fünften β -Faltblattstranges, verglichen mit anderen langkettigen Flavodoxinen (Abbildung 11). Es wird angenommen, dass diese Region sowohl für die Substratbindung als auch die Membranassoziation verantwortlich ist (Boynton *et al.*, 2009). Sie weist eine amphipathische helikale Konformation auf, wobei sich auf der einen Seite hauptsächlich unpolare Seitenketten und auf der anderen Seite einfach geladene Reste befinden. Diese Zusammensetzung könnte die Fähigkeit von HemG erklären, Elektronen zu lipophilen Quinonen über membrangebundene Atmungskomplexe zu leiten (Boynton *et al.*, 2009) (Abbildung 12).

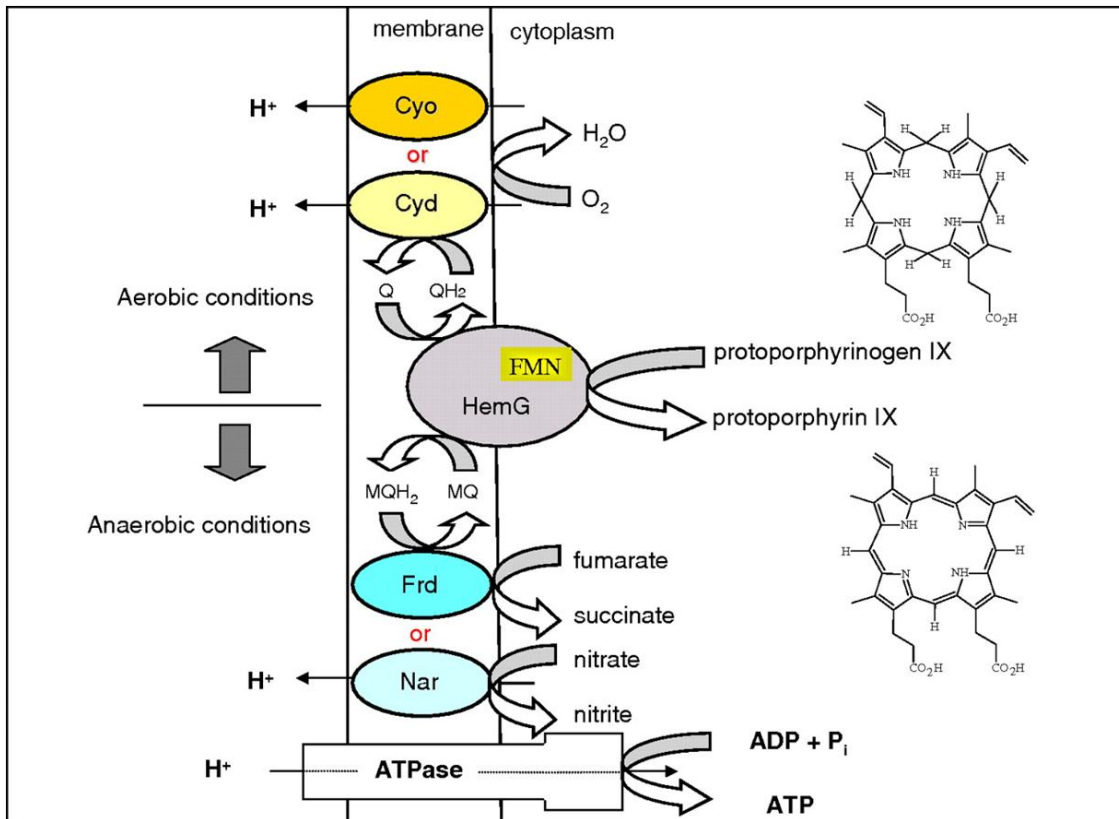


Abbildung 12: Modell der Protoporphyrinogen IX Oxidase gekoppelten Elektronentransferreaktionen und der ATP-Generierung in *Escherichia coli*.

PPO katalysiert die Reaktion von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX. Die dabei frei werdenden Elektronen werden in den Chinonpool eingeschleust. Elektronenaufnahme von terminalen Oxidasen recyceln Chinone. Drei der Oxidasen koppeln Elektronentransport mit Protonentransfer über die Membran. Die dadurch entstehende Protonenmotorische Kraft wird zu ATP Gewinnung durch die ATPase genutzt (Möbius *et al.*, 2010).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass HemG Elektronen an terminale Oxidoreduktasen, wie Fumaratreduktase, Nitratreduktase, Cytochrom *bd* Oxidase und Cytochrom *b_o* Oxidase weitergeben kann (Möbius *et al.*, 2010). Derzeit wird ein Model angenommen (Abbildung 12), bei dem HemG sowohl aerob als auch anaerob aktiv ist. Unter aeroben Bedingungen gibt es die Elektronen an Ubiquinon weiter, welches diese dann an die Sauerstoff-abhängigen Chinol Oxidasen weitergibt. Unter anaeroben Bedingungen hingegen werden die Elektronen zunächst an Menaquinon geleitet, welches diese dann an die Fumaratreduktase oder die Nitratreduktase leitet (Möbius *et al.*, 2010). Die sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen durch diese Redoxreaktionen freigesetzten Protonen treiben dann durch die protonenmotorische Kraft die ATPase an, wodurch ATP entsteht ((Möbius *et al.*, 2010), Abbildung 12).

1.2 Die Gattung Leishmania

Die Gattung *Leishmania* ist nach dem schottischen Pathologen William Boog Leishman benannt. Es handelt sich um eine Gattung geißeltragender Protozoen, welche in die Familie der Trypanosomatidae gehört und somit in die Domäne der Eukaryoten (Row, 1912). Bekanntheit erlangte die Gattung vor allem durch ihre Fähigkeit den Menschen zu infizieren und eine zum Teil tödlich verlaufende Krankheit, die Leishmaniose auszulösen (Burchmore und Barrett, 2001). Die WHO schätzt, dass es 1.3 Millionen neu Erkrankte und 20.000 bis 30.000 Todesfälle pro Jahr gibt (WHO, 2010).

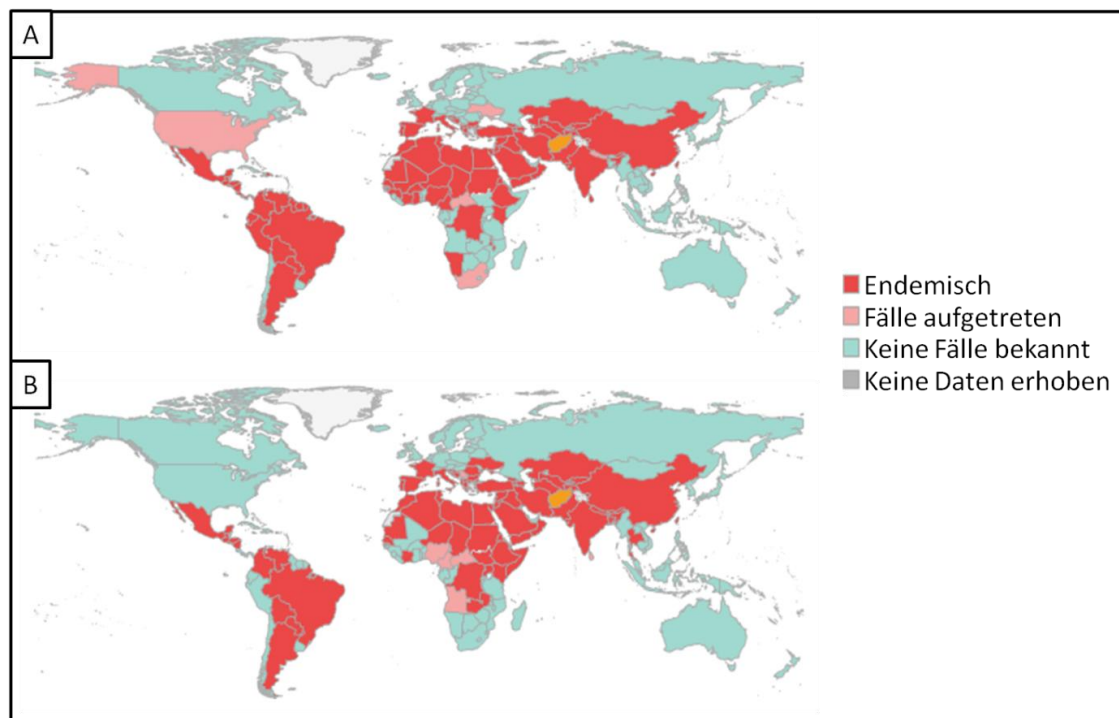


Abbildung 13: Überblick über Endemiegebiete der Leishmaniose.

A: Endemiegebiete der kutanen Leishmaniose; B: Endemiegebiete der viszeralen Leishmaniose (WHO, 2010).

Es gibt drei Formen der Leishmaniose, die kutane, die mukokutane und die viszerale Leishmaniose (WHO, 2010). Letztere ist die aggressivste Form der Leishmaniose und besser bekannt unter dem Namen Kala-azar, was auf Hindi so viel bedeutet wie schwarzes Fieber. Gekennzeichnet ist sie durch irreguläre Fieberanfälle, Gewichtsverlust, Vergrößerung von Leber und Milz und Anämie. Mit 90 % aller Fälle ist Kala-azar hauptsächlich in Bangladesch, Brasilien, Äthiopien, Indien, Südsudan und dem Sudan verbreitet ((WHO, 2010), Abbildung 13). Häufiger jedoch als die viszerale Form der Leishmaniose kommt die kutane Form vor. Sie wird auch als Orientbeule bezeichnet und hat lebenslange Läsionen der Haut zur Folge (WHO, 2010). Die kutane

Form lässt sich relativ gut behandeln, kann aber unbehandelt dramatisch verlaufen, falls die Leishmanien in innere Organe vordringen und dort die Makrophagen befallen. Dies kann wie die viszerale Form zu einer Vergrößerung von Leber und Milz führen und aufgrund von Blutgerinnungsstörungen und sekundären Infektionen zum Tod (WHO, 2010). Hauptverbreitungsgebiete der kutanen Leishmaniose sind Afghanistan, Algerien, Brasilien, Kolumbien, Iran und die Arabische Republik Syrien ((WHO, 2010), Abbildung 13). Die mukokutane Leishmaniose führt zur teilweisen oder vollständigen Zerstörung der Schleimhäute von Nase, Mund und Kehle. Fast alle bekannten Fälle sind in Bolivien, Brasilien und Peru aufgetreten ((WHO, 2010), Abbildung 13). Die Übertragung der Leishmanien erfolgt über Stiche der Sandmücke (Phlebotominae der Familie Psychodidae, (WHO, 2010)). Hierbei können 21 von insgesamt 30 *Leishmania* Arten den Menschen infizieren. Dazu gehören *L. donovani* mit den Unterarten *L. donovani* und *L. infantum* (auch bekannt als *L. chagasi*), *L. mexicana* mit den drei Unterarten *L. mexicana*, *L. amazonensis* und *L. venezuelensis*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* sowie aus der Untergattung *Viannia* die Arten *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* und *L. (V.) peruviana*. Die einzelnen Spezies sind morphologisch nicht zu unterscheiden können jedoch anhand von Isoenzymanalysen, Genotypisierung oder Antikörnernachweis unterschieden werden (Saha *et al.*, 2011). Der Infektionszyklus der Leishmanien, welcher in Abbildung 14 dargestellt ist, beginnt mit einem Stich einer *Leishmania* tragenden Sandmücke zur Blutaufnahme.

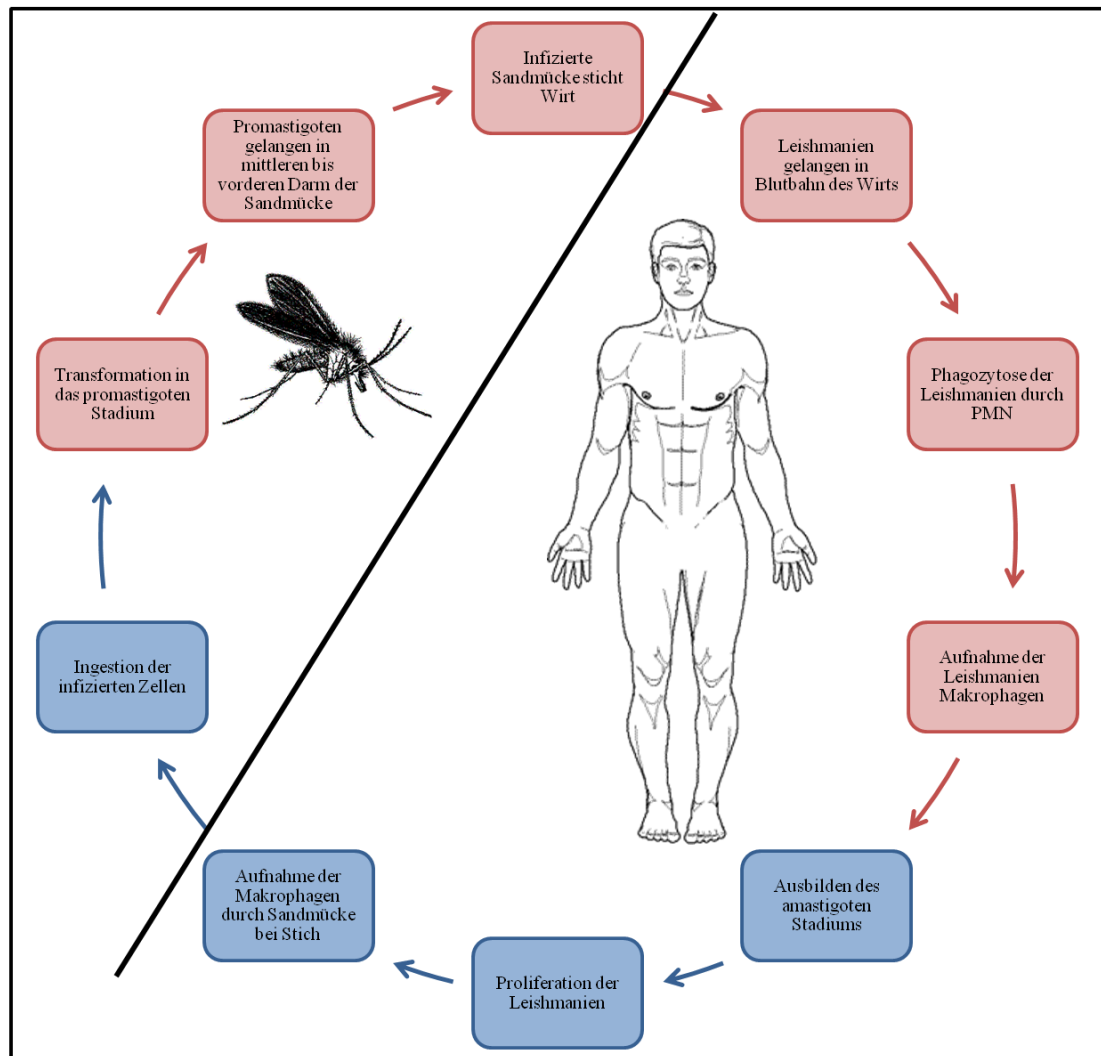


Abbildung 14: Infektionszyklus von Leishmania.

Blau: Amastigoter Phänotyp von Leishmania; Rot: Promastigoter Phänotyp von Leishmania; Rechts: humane Phase; Links: Sandmücken Phase.

Durch die Läsion der Haut gelangen die Leishmanien in den humanen Wirt. Zu dieser Zeit befinden sich die Leishmanien im promastigoten Stadium ihrer Entwicklung (Handman und Bullen, 2002), Abbildung 15B). Dieses zeichnet sich durch eine spindelartige Form von ca. 20 µm Länge und 5 µm Breite sowie eine lange externe Flagelle am anterioren Ende aus. Der Nucleus befindet sich mittig direkt hinter dem Kinetoplast und Basalkörper (Pulvertaft und Hoyle, 1960). Aufgrund der Verletzung der Haut durch den Einstich der Sandmücke wird die humorale Immunantwort des Wirts ausgelöst. Hierbei gelangen phagozytierende polymorphonucleare neutrophile Granulozyten (PMN) aus dem Blutstrom in das infizierte Gewebe. Als erste Immunantwort phagozytieren diese die eingedrungenen Leishmanien, welche sie aufgrund ihrer Andersartigkeit und somit aktivierend wirkenden Zellmembran

erkennen. Die durch die Aufnahme der Pathogene aktivierten PMN sekretieren nun Chemokine, genauer Interleukin 8 (IL-8) wodurch weitere Granulozyten angelockt werden und die Phagozytose der Leishmanien stimuliert wird. Hierbei ist interessant, dass *Leishmania major* die IL-8 Bildung sogar noch steigert und zudem den Leishmania chemotaktischen Faktor (LCF) ausschüttet, wodurch weitere Neutrophile angelockt werden, jedoch weder Monozyten noch NK-Zellen. Zudem gelingt es *L. major* die Biosynthese der PMN so zu verändern, dass es nicht zum oxidativen „Burst“ kommt. Darüberhinaus verhindern sie die Produktion des Interferon Gamma (IFN γ) induzierten Protein 10 (IP10) wodurch die inflammatorische und protektive Immunantwort durch NK- und TH1-Zellen nicht erfolgt. Anstelle dessen werden die PMN dazu angeregt sogenannte „apoptotic cell associated molecular pattern (ACAMP)“ auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, welche „kein Pathogen“ signalisieren (Cunningham, 2002). Leishmanien vermehren sich jedoch nicht in PMN sondern persistieren nur in ihnen und sind auf Makrophagen zur Proliferation angewiesen (Handman und Bullen, 2002). Da diese jedoch erst nach 2-3 Tagen in das infizierte Gewebe abgegeben werden und PMN durchschnittlich nur eine Lebensdauer von 6 bis 10 Stunden aufweisen, inhibieren Leishmanien die Caspase-3 Aktivität der PMN, wodurch ihre Lebensspanne mindestens 2-3 Tage überdauert (Laskay *et al.*, 2003). Durch die Induktion der Produktion der Makrophagen inflammatorischen Proteine MIP-1 α und MIP-1 β der PMN durch Leishmania werden zudem Makrophagen in das infizierte Gewebe rekrutiert. Es ist derzeit noch nicht geklärt, wie die Leishmanien in die Makrophagen gelangen (Laskay *et al.*, 2003). Ein Ansatz ist die „Stille Phagozytose“. Nach dieser Hypothese werden die Leishmanien über die PMN von den Makrophagen aufgenommen. Hierbei präsentieren apoptotische PMN Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche, welches für die Makrophagen ein Signal zur Phagozytose und dem Abbau der PMN darstellt (van Zandbergen *et al.*, 2004). Diese Hypothese ist jedoch umstritten, da es Beobachtungen gibt nach denen die Leishmanien schon vor der Phagozytose der PMN diese verlassen (Olivier *et al.*, 2005). Innerhalb der Makrophagen verändert sich der Phänotyp der Leishmanien hin zur amastigoten Form (Handman und Bullen, 2002). Diese ist rundlicher und mit nur 2 μ m deutlich kleiner. Zudem weist sie keine äußere Flagelle mehr auf. Vielmehr befindet sich die Flagelle dieser Form eingebettet am anterioren Ende der Zelle, wodurch Leishmania nicht länger beweglich ist ((Pulvertaft und Hoyle, 1960), Abbildung 15A). Die Amastigoten vermehren sich daraufhin in den

Makrophagen. Es ist nachgewiesen, dass die Ausprägung der Amastigote und damit die Fähigkeit zur Proliferation einen aciden pH benötigt. Eine erneute Aufnahme von Blut durch eine Mücke führt zu einer Aufnahme von Leishmanien enthaltenden Makrophagen durch die Mücke. Im Darm der Mücke kommt es zur Zerstörung der Makrophagen, wodurch die Amastigoten dort freigesetzt werden. Hier kommt es zu einer Veränderung des Phänotypen zur promastigoten Form. Die Promastigoten sind in der Lage aktiv aus dem Mittel- bzw. Enddarm in den Probocis (Rüssel) der Mücke zu schwimmen, wodurch sie bei erneuter Blutaufnahme der Mücke wiederrum in den humanen Wirt gelangen (Cunningham, 2002).

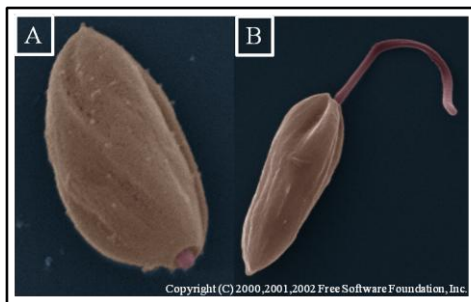


Abbildung 15: Phänotypische Ausprägungen von Leishmania.

Falschfarben Rasterelektronenaufnahme von *Leishmania mexicana*. Orange: Zellkörper; Rot: Flagellum; A: Amastigote (219 pixels/ μm); B: Promastigote (119 pixels/ μm).

Auch wenn eine Übertragung zwischen Sandmücke und Mensch vorkommt, scheint der Mensch nicht der natürliche Wirt von Leishmanien zu sein. Vielmehr scheint es sich hierbei um Hunde und Nager zu handeln. Es gibt heutzutage verschiedene Möglichkeiten Leishmanien diagnostisch nachzuweisen, bei denen einige jedoch nur in speziell dafür ausgelegten Laboratorien erfolgen (Saha *et al.*, 2011). Es können zum Beispiel Gewebeproben mikroskopisch untersucht werden, wobei die Leishmanien dann meist in den Makrophagen durch klassische Färbemethoden visualisiert werden können. Neben Gewebeproben können auch Blutproben auf spezielle Antikörper hin untersucht werden (Saha *et al.*, 2011). Je nach Art der Leishmaniose werden nach der Diagnose unterschiedliche therapeutische Ansätze gewählt (Davis und Kedzierski, 2005). Die Kosten für die Medikamente liegen zwischen 15 \$ für die 21 Tage dauernde Behandlung mit Paromomycin und 252 \$ für die 2 bis 4 Tage dauernde Behandlung mit liposomalem Amphotericin B (AmBisome®, Gilead, USA) (WHO, 2010). Bei der Behandlung werden allerdings auch die Nebenwirkungen der einzelnen Medikamente berücksichtigt. Diese reichen von leichten Hautausschlägen bis hin zum „red man“-Syndroms sowie von Störungen des Verdauungstraktes wie für Amphotericin B

beschrieben (WHO, 2010) bis zu starken Schmerzen in der Nähe der Verabreichungsstelle, Pankreatitis und Nierenschädigungen wie im Fall von Natriumstibogluconat und Meglumin Antimoniat, in Deutschland vertrieben unter dem Namen Glucantime (WHO, 2010).

1.2.1 Die Rolle von Häm innerhalb der Gattung *Leishmania*

Häm ist bedeutend für viele lebenswichtige Prozesse in *Leishmania*. Besondere Aufmerksamkeit liegt hier bei der Fettsäurebiosynthese, da sie essentiell für den parasitären Lebenszyklus ist (Tripodi *et al.*, 2011). *Leishmania major* kann Docosahexanonsäure (DHA) und Docosapentaensäure (DPA) aus Oleat aufbauen. Diese Substanzen gehören zur Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, deren Synthese von Elongasen und Desaturasen katalysiert werden. Hierbei benötigen die Desaturasen von *Leishmania* Cytochrom b_5 (Cyt b_5) als Elektronendonator. Cyt b_5 ist auch bekannt als Elektronendonator der Nitratreduktase in *Leishmania*. Es handelt sich hierbei um ein Häm-bindendes Protein (Koreny *et al.*, 2013). Neben den Fettsäuren ist auch Ergosterol ein Bestandteil der Zellmembran von Leishmanien. An der Biosynthese von Ergosterol ist die Sterol-14- α -demethylase CYP51 beteiligt. Es handelt sich hierbei um ein zur Cytochrom P450 (Cyt P450) Superfamilie gehörendes Enzym. Es ist an der oxidativen Entfernung der 14- α -Methylgruppe von Lanosterol beteiligt. Die für diese Reaktion benötigten Elektronen werden von der NADPH-Cyt P450-Reduktase und Cyt b_5 geliefert. Auch Cyt P450 gehört in die Gruppe der Häm-bindenden Enzyme (Schleyer *et al.*, 1972). Ein weiteres essentielles Cytochrom der *Leishmania* spp. ist Cytochrom c (Cyt c), welches am Elektronentransfer während der oxidativen Phosphorylierung beteiligt ist. In den meisten Cyt c ist Häm kovalent über 2 Thioether zwischen den Vinyl-Gruppen des Häms und den Thiol-Resten des Cysteins in einem CXXCH-Motiv gebunden. In *Leishmania* hingegen ist das Häm nur über eine Thioether Bindung innerhalb eines F/AXXCH Motivs gebunden (Tripodi *et al.*, 2011). Zudem ist bis heute kein Cyt c Maturationssystem für *L. major* bekannt (Tripodi *et al.*, 2011). Obwohl Häm in *Leishmania* spp. somit essentiell für das Überleben des Organismus ist, existiert keine vollständige Häm-Biosynthese innerhalb der Gattung *Leishmania* (Koreny *et al.*, 2010).

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass *Leishmania* in der Lage ist, in Medium bei dem Hämin durch Protoporphyrin IX ersetzt wurde zu wachsen. Dies lässt

auf eine aktive Ferrochelatase (FC) schließen (Chang und Chang, 1985). In *L. donovani* wurde die Aktivität dieser FC und darüber hinaus die der 5'-Aminolevulinsäure Synthase (ALAS) nachgewiesen (Chang und Chang, 1985). Versuche von co-Transfektionen von Porphobilinogen Synthase (PBGS) und Porphobilinogen Deaminase (PBGD) in *L. amazonensis* führten jedoch erst nach Zugabe von 5'-Aminolevulinsäure zur Bildung von Porphyrinen. Dies deutet auf eine nicht funktionsfähige ALAS in *L. amazonensis* hin (Koreny *et al.*, 2010). Aufgrund der nötigen co-Transfektion von PBGS und PBGD zur Bildung von Porphyrinen scheinen auch diese beiden Enzyme der Häm-Biosynthese nicht in *Leishmania* codiert zu sein. Bei dem gebildeten Porphyrin handelte es sich um Uroporphyrin I. Dies wiederum legt nahe, dass auch die Uroporphyrinogen III Synthase (UROS) im Genom von *L. amazonensis* fehlt (Koreny *et al.*, 2010). Eine funktionsfähige UROS würde aus Pre-Uroporphyrinogen Uroporphyrinogen III synthetisieren. Zudem weist die Akkumulation von Uroporphyrin I auf die Abwesenheit der Uroporphyrinogen III Decarboxylase (UROD) hin (Koreny *et al.*, 2010). Diese würde ausgehend vom Substrat Uroporphyrinogen I die Reaktion zu Coproporphyrinogen I katalysieren, welches als Coproporphyrin I akkumulieren würde (Koreny *et al.*, 2010). Für *L. major* konnte gezeigt werden, dass bei einer co-Transfektion von PBGS, PBGD und UROD Coproporphyrin I als Endprodukt entsteht (Koreny *et al.*, 2010). Eine weiterführende Analyse des Genoms von verschiedenen *Leishmania*-Arten *in silico* identifizierte Homologe zu den letzten drei Enzymen (Coproporphyrinogen III Oxidase (CPO), Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO) und Ferrochelatase (FC)) der Häm Biosynthese aus gamma-Proteobakterien (Koreny *et al.*, 2013). Daraus wurde geschlossen, dass diese Gene durch horizontalen Gentransfer aufgenommen wurden nachdem ein Urahn der Gattung *Leishmania* die Fähigkeit zur Häm-Biosynthese komplett verloren hatte (Koreny *et al.*, 2010). Dass ausgerechnet die letzten drei Gene aufgenommen wurden, wird durch die einfachere Zugänglichkeit zu Coproporphyrinogen III im Vergleich zu Häm im Lebensraum von *Leishmania* spp. erklärt (Opperdoes und Michels, 2008). Diese Idee verdeutlicht sich durch die Betrachtung der Hauptaufgabe der Makrophagen, dem bevorzugten Wirt der Leishmanien, der im Abbau von apoptotischen Zellen wie zum Beispiel Erythrozyten liegt. Hierbei wird auch Häm durch die Hämoxygenase I (HO) abgebaut, wobei üblicherweise das wasserlösliche lineare Tetrapyrrol Bilirubin entsteht (Opperdoes und Michels, 2008). Es wird jedoch angenommen, dass beim Abbau von

Häm innerhalb der Phagolysosomen der Makrophagen diese mit den parasitophoren Vakuolen, in denen *Leishmania* proliferiert, verschmelzen. Ein Teil der Häme wird darin chemisch so modifiziert, dass sie den Abbau umgehen und als Substrat für die Häm-Biosynthese der Leishmanien fungieren (Opperdoes und Michels, 2008). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass *Leishmania pifanoi* die HO Produktion der Wirtszelle anregt (Pham *et al.*, 2005). Eine andere These geht davon aus, dass *Leishmania* einen Mechanismus entwickelt hat um direkt das cytosolische Coproporphyrinogen III der Wirtszelle aufzunehmen ((Opperdoes und Michels, 2008), Abbildung 16).

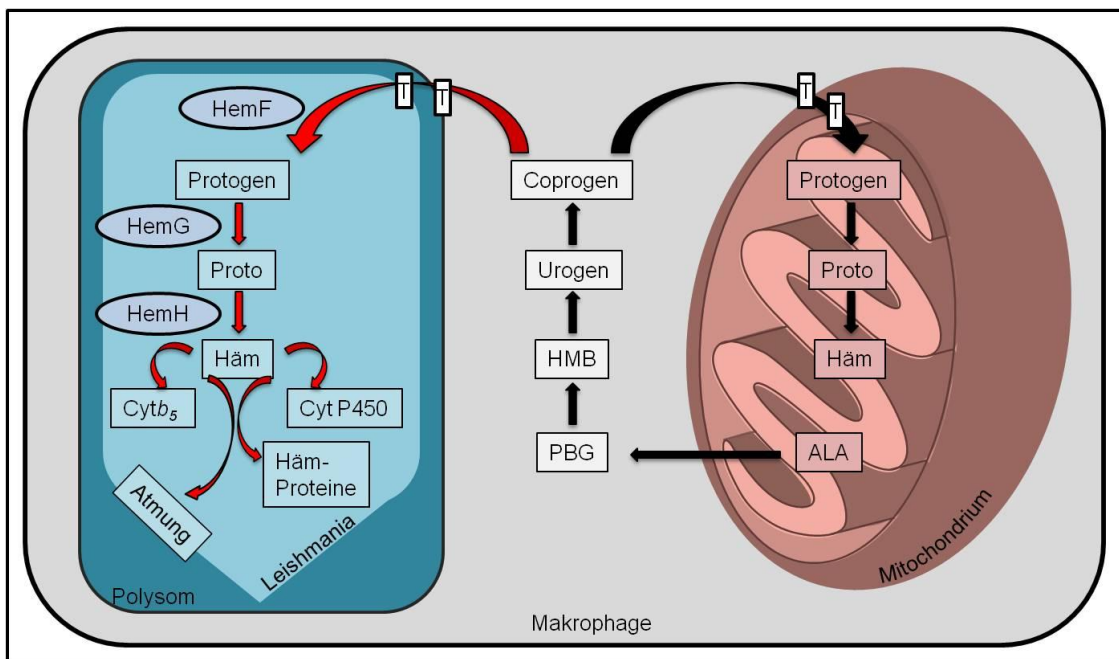


Abbildung 16: Modell der Häm-Biosynthese von *Leishmania major* in Makrophagen.

Abgebildet ist ein Makrophage mit Mitochondrium (rechts, braun) und einem Polysom (links, petrol) mit Leishmaniazelle (links, hellblau). Die Häm-Biosynthese startet innerhalb des Mitochondriums. PBG wird in das Cytosol (grau) transportiert wo es zu Coprogen umgewandelt wird. Coprogen wird über Transporter in Leishmania transportiert und zu Häm umgesetzt. HemF: sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase; HemG: sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase; HemH: Ferrochelatase; ALA: δ-Aminolevulin Säure; PBG: Porphobilinogen; HMB: Hydroxymethylbilan; Urogen: Uroporphyrinogen III; Coprogen: Coproporphyrinogen III; Proto: Protoporphyrin IX; Proto: Protoporphyrin IX; Cyt *b*₅: Cytochrom *b*₅; Cyt P450: Cytochrome P450; T: Transporter.

Zusätzlich zu den drei letzten Enzymen der Häm Biosynthese wurde kürzlich auch ein Häm-Transporter (LRH1) in *L. amazonensis* entdeckt (Huynh *et al.*, 2012). Die Autoren vermuten, dass aufgrund der beschriebenen Häm-Auxotrophie von *Leishmania* Häm direkt mit Hilfe von LRH1 aufgenommen und in Häm-Proteine eingebaut wird (Huynh *et al.*, 2012). Für *L. infantum* Amastigoten wurde vorher schon beschrieben, dass Häm als Eisenquelle aufgenommen wird (Carvalho *et al.*, 2009). Dieses Phänomen ist auch

von pathogenen Bakterien wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* bekannt (Cornelis und Dingemans, 2013). Es bleibt also fraglich, ob der Genus *Leishmania* in der Lage ist selbst Häm zu synthetisieren, zumindest ausgehend von Coproporphyrinogen III, oder Häm über Transporter aufnimmt. Eine Mischform aus beiden je nach Umweltbedingungen ist ebenfalls denkbar.

1.3 Ziel der Arbeit

Die Biosynthese von Häm galt lange Zeit als stark konservierter Stoffwechselweg in allen Reichen des Lebens. Mit der fortschreitenden Sequenzieretechnologie und der Entwicklung von Datenbanken wurden jedoch auch immer mehr komplette Genomsequenzen analysierbar. Hierbei wurde festgestellt, dass Organismen welche Hämoproteine nutzen, ein oder mehrere bekannte Gene kodierend für Enzyme der Häm-Biosynthese nicht aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Gen für die Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *P. aeruginosa* durch Komplementation einer $\Delta hemG$ *E. coli* Mutante identifiziert werden. Zudem sollte die Funktionalität der *L. major* PPO *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden, und das Protein sollte im Folgenden hinsichtlich seines Kofaktors und seiner katalytisch aktiven Region näher charakterisiert werden. Die putative Coproporphyrinogen III Oxidase YtpQ von *B. subtilis* war ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Hierbei sollte zunächst die CPO Aktivität getestet und ein möglicher Metallkofaktor identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Die in dieser Arbeit genutzten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders deklariert, von folgenden Firmen bezogen und in der Qualität *per analysis* (*p. a.*) benutzt: Gerbu (Heidelberg, Deutschland), J.T.Baker (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Geräte

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller
Agarosegelelektrophorese - Apparatur	Agagel Mini	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Anaerobe Kammer	Type B Flexible vinyl chamber	COY Laboratory Products Inc.(Grass Lake Charter Township, MI, USA
Autoklav	LVSA 50/70	Zirbus (Bad Grund, Deutschland)
Geldokumentationsanlage	UV-Transilluminator	WE ALTEC
Hochdruck-Flüssigkeits Chromatographie (HPLC)	Jasco 1500 Serie	Jasco (Gross-Umstadt, Deutschland)
	Jasco 2000 Serie	Jasco
Konzentratoren	Vivaspin® 6 Centrifugal Concentrator	Sartorius Vivascience (Göttingen, Deutschland)
	Vivaspin® 15 Turbo Centrifugal Concentrator	Sartorius Vivascience
Lumineszenzspektrometer	LS50B	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
pH - Messgerät	pH-Meter C 6840 B	Schott (Mainz, Deutschland)
Photometer	Ultrospec 2100 pro	GEHealthcare (Braunschweig, Deutschland)

	Spectrophotometer ND-1000	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reinstwasseranlage	Milli-Q®-Synthesis	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Rührer	MR3001	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
SDS-PAGE - Apparatur	Mini Protean II	BioRad (Hercules, CA, USA)
Sterile Werkbank	HeraSafe KS	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Thermocycler	TPersonal peqSTAR 96 x Universal	Biometra peqlab
Thermomixer	Thermomixer compact Thermomixer comfort	Eppendorf Eppendorf
Ultraschallgerät	UW 2070	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Vortexgerät	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waagen	SBA 52	Mettler-Toledo (Giesen, Deutschland)
Zentrifugen	Qik Spin QS7000	Edwards Instrument Co (Narellan, Australien)
	Minispin	Eppendorf
	Biofuge PrimoR	Thermo Scientific
	Avanti®-J-E Zentrifuge	Beckman Coulter (Pasadena, CA, USA)
	Optima™ L-90K Ultracentrifuge	Beckman Coulter

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

2.2.1 Bakterienstämme

In Tabelle 2 sind alle Bakterienstämme, welche in dieser Arbeit genutzt wurden aufgeführt.

Tabelle 2: In der Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> LG285	<i>hemG:kan^R, supE44, supF58, HsdR514, galK2, galT22, metB1, trpR55, lacY1</i>	PPO Mutante, für Komplementationsstudien	NBRP- <i>E. coli</i> at NIG (Shizuoka, Japan)
<i>E. coli</i> SASX38	<i>hemG38</i> Mutation in <i>E. coli</i> Hfr Cavalli	Chemisch induzierte PPO Mutante	(Sasarman <i>et al.</i> , 1979)
<i>E. coli</i> LE392	<i>glnV44, supF58 (lacY1 or ΔlacZY) galK2, galT22, metB1 trpR55, hsdR514(rK-mK+)</i>	<i>E. coli</i> Wildtyp, für Komplementationsstudien	Promega (Madison, WI, USA)
<i>E. coli</i> K12	<i>F+</i> , <i>lambda+</i>	<i>E. coli</i> Wildtyp, für Komplementationsstudien	ATCC 10798
<i>E. coli</i> DH10B	<i>F-</i> , <i>endA1, recA1, galE15, galK16, nupG, rpsL, ΔlacX74, Φ80lacZΔM15, araD139, Δ(ara, leu)7697, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), λ-</i>	<i>E. coli</i> Klonierungsstamm Strep ^R	Invitrogen (Karlsbad, CA, USA)

<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>endA1, glnV44, recA1, thi-1, gyrA96, relA1, lac, the, Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, tet^R, F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]</i>	<i>E. coli</i> Klonierungsstamm	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169, phoA, glnV44 Φ80, Δ(lacZ)M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17</i>	<i>E. coli</i> Klonierungsstamm, für Erstellung von Proteinmutationen	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F⁻, ompT, gal, dcm, lon, hsdSB(rB⁻ mB⁻), λ(DE3 [lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5])</i>	<i>E. coli</i> Produktionsstamm	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Derivat, trägt pLys Plasmid	<i>E. coli</i> Produktionsstamm, verbesserte Induktionskontrolle durch pLys	Stratagene
<i>E. coli</i> OverExpress^(tm) C43(DE3)	<i>F⁻, ompT, gal, dcm, hsdSB(rB⁻ mB⁻) (DE3)</i>	<i>E. coli</i> Produktionsstamm, Tolerant für toxische Proteine	Lucigen (Middletown, WI, USA)

<i>E. coli</i>	<i>F</i> ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i>	<i>E. coli</i>	Lucigen
OverExpress ^(tm)	(<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i>	Produktionsstamm,	
C41(DE3)	(DE3)	Tolerant für anderes Set	
		toxischer Gene als <i>E.</i>	
		<i>coli</i> OverExpress ^(tm)	
		C43(DE3)	

2.2.2 Plasmide

In Tabelle 3 sind alle Plasmide, welche in dieser Arbeit genutzt wurden aufgeführt.

Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pGEX-6-P1	Expressionsvektor, trägt N-terminal Glutathion S-transferase - Tag, pBR322 ori, Amp ^R	GE Healthcare (Braunschweig, Deutschland)
pCDF-Duet-1	Expressionsvektor, trägt N-terminal His _{6x} - Tag in 1. MCS und C-terminal S-Tag in 2. MCS, CloDF13 ori, Strep ^R	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
pACYC-Duet-1	Expressionsvektor, trägt N-terminal His _{6x} - Tag in 1. MCS und C-terminal S-Tag in 2. MCS, p15A ori, Cm ^R	Novagen
pET-Duet-1	Expressionsvektor, trägt N-terminal His _{6x} - Tag in 1. MCS und C-terminal S-Tag in 2. MCS, ColE1 ori, Amp ^R	Novagen
pGEXhemGL	<i>L. major hemG</i> zwischen BamHI und NotI Schnittstelle von pGEX-6-P1 kloniert, trägt N-terminal Glutathion S-transferase - Tag	Simone Karrie
pGEXhemGLY134F	pGEXhemGL -Derivat, das für ein <i>L. major</i> HemG-Protein mit dem Aminosäureaustausch Tyr 134 gegen Phe kodiert	diese Arbeit

pGEXhemGLY137A	pGEXhemGL -Derivat, das für ein <i>L. major</i> HemG-Protein mit dem Aminosäureaustausch Tyr 137 gegen Ala kodiert	diese Arbeit
pGEXhemGLY137F	pGEXhemGL -Derivat, das für ein <i>L. major</i> HemG-Protein mit dem Aminosäureaustausch Tyr 137 gegen Phe kodiert	diese Arbeit
pGEXhemGLY137S	pGEXhemGL -Derivat, das für ein <i>L. major</i> HemG-Protein mit dem Aminosäureaustausch Tyr 137 gegen Ser kodiert	diese Arbeit
pGEXhemGLR142A	pGEXhemGL -Derivat, das für ein <i>L. major</i> HemG-Protein mit dem Aminosäureaustausch Arg 142 gegen Ala kodiert	diese Arbeit
pET32ahemGL	<i>L. major hemG</i> zwischen BamHI und NotI Schnittstelle von pET32a kloniert, trägt N-terminal S-Tag, His _{6x} -Tag und Trx-Tag	Simone Karrie
pTrcHisA-ytpQ_{B.s.}	<i>Bacillus subtilis ytpQ</i> zwischen NheI und HindIII Schnittstelle von pTrcHisA kloniert, trägt N-terminal His _{6x} -Tag	Harry Dailey
pCDF-Duet-1hemJ	<i>Synechocystis sp. PCC6803 hemJ</i> zwischen EcoRI und HindIII Schnittstelle von pCDF-Duet-1 kloniert, trägt N-terminal His _{6x} -Tag	diese Arbeit
pCDF-Duet-1hemG	<i>E. coli hemG</i> zwischen SacI und PstI Schnittstelle von pCDF-Duet-1 kloniert, trägt N-terminal His _{6x} -Tag	Katrin Riedmann, 2007

2.3 Oligonukleotide

In Tabelle 4 sind alle Oligonukleotide (Primer), welche in dieser Arbeit genutzt wurden aufgeführt.

Tabelle 4: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
PA5028 EcoRI fw	TACCTAGAATTCATGCGGCGCGTGGTG TTC	Primer für die Klonierung von PA5028 in pGEX-6P-1
PA5028 XhoI rev	TACCTACTCGAGTCAGCTTTCGAGCAG CCC	Primer für die Klonierung von PA5028 in pGEX-6P-1
HemGL Y137F fw	GTATCCGCGTTTTTAATTTTTTTTGATCGC	Primer für den Aminosäureaustausch von Tyr 137 zu Phe
HemGL Y137S fw	TATCCGCGTTCTAATTTTTTTTGATCGCG	Primer für den Aminosäureaustausch von Tyr 137 zu Ser
HemGL Y137A fw	GTATCCGCGTGCTAATTTTTTTTGATCGC G	Primer für den Aminosäureaustausch von Tyr 137 zu Ala
HemGL Y137A rev	CACAGTGCACCGGCAAAA	Primer für den Aminosäureaustausch von Tyr 137 zu Phe, Ser oder Ala
HemGL Y134F fw	TGCACTGTGGTTTCCGCGTTATA	Primer für den Aminosäureaustausch von Tyr 134 zu Phe
HemGL Y134F rev	ACCGGCAAAAACACCAAC	Primer für den Aminosäureaustausch von Tyr 134 zu Phe
HemGL R142A fw	TTTTTTTGATGCCGTGCTGATTCAGTTT ATTATGAAAG	Primer für den Aminosäureaustausch von Arg 142 zu Ala

HemGL	ATTATAACGCGGATACCAC	Primer für den
R142A		Aminosäureaustausch
rev		von Arg 142 zu Ala

2.4 Medien und Medienzusätze

2.4.1 Medien

Alle Medien wurden mit dest. Wasser hergestellt und vor Benutzung dampfsterilisiert. Zur Herstellung fester Medien wurden vor der Sterilisation 15 g/L Agar-Agar zum Medium hinzugefügt.

Zur Kultivierung von Bakterienzellen in Vollmedium wurde falls nicht anderweitig erwähnt Lysogeny broth (LB)-Medium verwendet.

Lysogeny broth (LB)-Medium (Bertani, 1951; Miller *et al.*, 1991):

Hefe-Extrakt	5	g/L
Protease-Pepton	10	g/L
Natriumchlorid	10	g/L

Nach chemischen Transformationen von NEB 5-alpha Competent *E. coli* wurde SOC-Medium verwendet.

SOC medium (Hanahan, 1983):

Hefeextrakt	5	g/L
Trypton	20	g/L
Natriumchlorid	0.6	g/L
Kaliumchlorid	2.5	mM

pH-Wert auf 7.0 mit 5 N NaOH eingestellt; Steril filtrierte Additiva wurden nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Magnesiumchlorid	10	mM
Magnesiumsulfat	10	mM
Glucose	20	mM

Als Komplementationsmedien wurden folgende Medien getestet:

NZ Medium (Hayes und Hayes, 1978):

Casein, enzym. gespalten	10	g/L
Natriumchlorid	5	g/L
Magnesiumchlorid	0.94	g/L

TCMG Medium (Burns *et al.*, 1990) modifiziert:

Casein Peptone	10	g/L
Natriumchlorid	5	g/L

M63 Medium (Ausubel, 2009):

Ammoniumsulfat	2	g/L
Kaliumdihydrogenphosphat	13.6	g/L
Eisen(II)-sulfat, wasserhaltig	0.5	mg/L

Steril filtrierte Additiva wurden nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Glycerol	2	g/L
Magnesiumsulfat	1	mM

M9 Medium (Clowes, 1968) modifiziert:

Dinatriumhydrogenphosphat	6	g/L
Kaliumdihydrogenphosphat	3	g/L
Natriumchlorid	0.5	g/L
Ammoniumchlorid	1	g/L

Steril filtrierte Additiva wurden nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Eisen(II)-sulfat, wasserhaltig	0.5	mg/L
Kalziumchlorid	0.1	mM
Magnesiumsulfat	2	mM
Casaminosäuren	0.002	%
Kohlenstoff-Quelle	0.2-1.2	%

Als Kohlenstoffquelle dienten Glucose oder Glycerin.

2.4.2 Medienzusätze

In

Tabelle 5 sind alle Medienzusätze, welche in dieser Arbeit genutzt wurden aufgeführt.

Tabelle 5: In dieser Arbeit genutzte Additiva

Additiv	Stammkonzentration	Endkonzentration
5-Aminolävulinsäure-Hydrochlorid (ALA)	50 mg/mL in H ₂ O _{dest}	50 µg/mL
Ampicillin (Amp)	100 mg/mL in H ₂ O _{dest}	100 µg/mL
Chloramphenicol (Cm)	34 mg/mL in 70 % Ethanol (v/v)	34 µg/mL
Hämin	50 mg/mL in 0.01 M KOH in 20 % Ethanol	50 µg/mL
Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid (IPTG)	1 M in H ₂ O _{dest}	500 µM
Kanamycin (Kan)	50 mg/mL in H ₂ O _{dest}	50 µg/mL
Streptomycin (Strep)	100 mg/mL in H ₂ O _{dest}	100 µg/mL
Tetracyclin (Tet)	5 mg/mL in 70 % Ethanol (v/v)	10 µg/mL
Vitamin B1	10 mg/mL H ₂ O _{dest}	1 µg/mL

2.5 Mikrobiologische Techniken

2.5.1 Sterilisation

Alle Medien und Puffer wurden für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert oder im Falle von temperaturempfindlichen Substanzen und Lösungen sterilfiltriert (Porengröße des Filters 0.2 µm).

2.5.2 Wachstumsbedingungen

Für die Herstellung von Vorkulturen wurde eine Einzelkolonie oder eine Probe aus einem Glycerinkonservat des entsprechenden Stammes in einem angemessenen Volumen LB-Medium, versetzt mit entsprechenden Additiva, inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Zur Erstellung der Hauptkultur für die Produktion wurde frisches Medium versetzt mit den entsprechenden Antibiotika und mit der Vorkultur im Verhältnis 1:100 beimpft. Die Hauptkulturen wurden bis zur Induktion bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinproduktion mit 500 µM IPTG erfolgte bei einer optischen Dichte (OD) bei 578 nm Wellenlänge von 0.6 - 0.8. Zur Kultivierung auf festen Medien wurden 50- 100 µL, für Komplementationsstudien bis zu 500 µL, einer Zellsuspension mittels Drygalski-Spatel oder Glaskugeln ausplattiert. Einzelkolonien oder Glycerinkonservate wurden mittels Impföse ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C kultiviert.

2.5.3 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm im Photometer gemessen. Für Zelldichten mit einer $OD_{578} \geq 1$ wurde eine 1:10-Verdünnung zur Vermessung erstellt. Hierbei entspricht eine OD_{578} von 1 einer ungefähren *E. coli* Zellzahl von 1×10^9 Zellen/mL.

2.5.4 Erstellung von Wachstumskinetiken

Zur Herstellung von Proben für die Wachstumskinetiken wurde die Vorkultur in 50 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (Kapitel 2.4.2) und 500 µM IPTG auf eine OD_{578} von 0.05 eingestellt. Wachstumskinetiken wurden für bis zu 48 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Alle 1 - 2 Stunden wurden Proben steril entnommen und der Anstieg der optischen Dichte wurde photometrisch bei $\lambda = 578$ nm nachvollzogen.

2.5.5 Aufbewahrung von Zellen

Bakterien auf festen Medien wurden bei 4 °C für nicht länger als 8 Wochen gelagert. Zur Aufbewahrung über längere Zeiträume wurden Glycerinkonservate erstellt. Hierfür wurden 800 µL einer Bakterienkultur mit 350 µL sterilem 80% -igem (v/v) Glycerin gemischt und direkt bei – 80 °C gelagert.

2.5.6 Kultivierung von anaeroben *E. coli* Kulturen

Zur Anerobisierung von *E. coli* Kulturen wurde das Kulturmedium, welches mit entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, vor Beimpfung durch den Austausch von Sauerstoff durch Stickstoff über mehrere Zyklen anerobisiert. Es wurden 30 Zyklen mit je einem 2 min Intervall zur Anaerobisierung genutzt. Das anaerobe Medium wurde mit

der Vorkultur im Verhältnis 1:100 unter Sauerstoffausschluss beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 150 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0.4 bevor sie mit IPTG induziert wurde. Die Proteinproduktion erfolgte bei 25 °C über Nacht.

2.5.7 Anaerobisierung von Puffern und Proteinlösungen

Anaerobe Arbeiten wurden in einer flexiblen anaeroben Kammer durchgeführt. Puffer und Proteinlösungen mit max. 2 mL Volumen wurden für 1 - 2 h offen in der Kammer anaerobisiert. Puffer mit größeren Volumina wurden durch Austausch des Sauerstoffs durch Stickstoff über mehrere Zyklen bestehend aus Ablassen und Zuführen von N₂ anaerobisiert. Die Anaerobisierung erfolgte über 30 Zyklen mit einem 2 min Intervall.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Präparation genomischer DNA

Bakterienstämme, aus denen genomische DNA extrahiert werden sollte, wurden über Nacht in Flüssigmedium kultiviert um eine möglichst hohe Zelldichte zu erlangen. 4 ml der Zellen wurden anschließend in zwei Schritten bei 11.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Zellaufschluss und die DNA Extraktion erfolgte mittels des NucleoSpin® Soil Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) laut den Anweisungen des Herstellers. Die extrahierte genomische DNA wurde in H₂O_{dest} bei 4 °C gelagert.

2.6.2 Präparation von Plasmid DNA

Bakterienstämme aus denen Plasmid DNA extrahiert werden sollte, wurden über Nacht in Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert. 6 mL der Zellen wurden anschließend in drei Schritten bei 11.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Zellaufschluss und die DNA Extraktion erfolgte mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Venlo, Niederlande) laut den Anweisungen des Herstellers. Die extrahierte Plasmid DNA wurde in H₂O_{dest} bei 4 °C gelagert.

2.6.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Die DNA Konzentration und Reinheit wurde photometrisch durch Absorbanzmessung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Über das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ wird die Reinheit bestimmt, wobei OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.8 - 2.0 als rein gilt.

2.6.4 Produktion und Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Für die Produktion von chemisch kompetenten Zellen wurde eine Vorkultur des entsprechenden *E. coli* Stammes im Verhältnis 1:100 in 50 mL LB-Medium mit entsprechenden Additiven inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0.6 kultiviert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 20 mL eiskalten TFB1 resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 3000 x g mit darauffolgender Resuspension des Zellsediments in 2 mL eiskalten TFB2. Nach einer Inkubation der Zellen für 15 - 60 min auf Eis wurden 50 µL Aliquots entweder direkt zur Transformation genutzt oder für eine spätere Verwendung bei - 80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 50 µL der zuvor erstellten kompetenten Zellen mit ca. 50 µg/mL Plasmid DNA gemischt. Im Falle von gefrorenen Aliquots wurden diese zuvor für 30 min auf Eis aufgetaut. Nach Mischung der Zellen mit der DNA wurden diese für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und eine direkte Abkühlung der Zellen für 2 min auf Eis. Im Anschluss daran wurden 300 µL LB Medium zu den Zellen gegeben und diese für 15 - 45 min bei 37 °C inkubiert bevor 50 - 100 µL der Zellen auf Festmedium mit entsprechenden Additiven ausplattiert wurden. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

TFB1	Kaliumacetat	30 mM
	Kalziumchlorid	10 mM
	Manganchlorid	50 mM
	Rubidiumchlorid	100 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	in H ₂ O _{dest} ; pH 5.8	
TFB2	MOPS	10 mM
	Kalziumchlorid	75 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	in H ₂ O _{dest} ; pH 6.5	

2.6.5 Agarose Gel Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA nach ihrer Molekülgröße wurde eine Agarosegel Elektrophorese mit 1%-igen Agarosegelen (1 % Agarose in TAE Puffer) durchgeführt. Die DNA wurde mit DNA Ladepuffer versetzt, was zum einen der visuellen Wahrnehmung der farblosen DNA und zum anderen der Beschwerung dieser, sodass sie in das Gel geladen werden konnte diente. GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wurde als Größenstandart entsprechend der Anleitung des Herstellers genutzt. Es wurde eine elektrische Spannung von 80 - 100 V, entsprechend der Größe des Gels, angelegt wodurch ein elektrisches Feld entstand in dem die negativ geladene DNA in Richtung der Anode wanderte. Hierbei war die Geschwindigkeit proportional zur Molekülgröße, wodurch kleinere Fragmente schneller wanderten. Nach der Agarosegel Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt. Hierzu wurde das Agarosegel für 15 - 30 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt. Anschließend wurde überschüssiges Ethidiumbromid durch kurze Spülung in einem Wasserbad beseitigt und die DNA wurde über die Fluoreszenz bei 312 nm visualisiert. Im Falle einer DNA Extraktion aus dem Agarosegel wie etwa für PCR-Produkte wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) entsprechend der Anleitung des Herstellers angewandt.

TAE Puffer (pH 8.0)	Tris-Acetat	40	mM
	EDTA	1	mM
	in H ₂ O _{dest}		

5 xDNA Ladepuffer	Bromophenolblau	350	μM
	Xylencyanol FF	450	μM
	Glycerin	50	% (w/v)
	in H ₂ O _{dest}		
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid	0.1	% (w/v)
	in H ₂ O _{dest}		

2.6.6 DNA Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von distinkten DNA Fragmenten *in vitro*. Der Standard Reaktionsmix enthält:

DNA	10-100	ng
5 x Phusion™ HF buffer	5	μL
forward Primer	10	pmol
reverse Primer	10	pmol
dNTP Mix	25	μM
Phusion™ DNA Polymerase	1	U
H ₂ O _{dest}	ad 25	μL

Die PCR begann mit einer einleitenden Denaturierung der DNA zur Einzelstranggenerierung. Hierauf erfolgte ein Zyklus aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Die Reaktion endet mit einem finalen Elongationsschritt. Die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer hängt vom GC-Gehalt und der Länge der Primer ab und kann mit folgender Formel berechnet werden.

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69.3 + 0.41(\% \text{G+C}) - 650/n$$

G+C repräsentiert den prozentualen Anteil an Guanin und Cytosin und n die Länge des Primers. Die Elongationzeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Ein PCR-Programm ist im Folgenden exemplarisch dargestellt, die verschiedenen Programme unterschieden sich nur durch ihre Hybridisierungstemperatur.

PCR Programm (exemplarisch):

95 °C	10 min	} 30 x
95 °C	30 s	
50 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	
10 °C	∞	

2.6.7 Gezielte Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Natürlicherweise kommen Restriktionsendonukleasen als Abwehrmechanismus gegen Fremd-DNA in vielen Mikroorganismen vor. Hierbei handelt es sich zumeist um TYP II Restriktionsendonukleasen. Bei dieser Klasse spaltet das Enzym die Phosphodiester-Bindung der DNA innerhalb oder kurz nach einer palindromischen DNA Erkennungssequenz, so dass je nach Enzym glatte Enden (engl. *blunt ends*) oder überhängende Enden (engl. *sticky ends*) entstehen. Die Restriktion von PCR-Produkten und Vektoren erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). Die Enzymkonzentration, Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen wurden der Anleitung des Herstellers entnommen. Die Inkubationszeit betrug 1 - 2 h und das Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und gereinigt wie in Abschnitt 2.6.5 beschrieben.

2.6.8 Ligation von DNA

Bei der Ligation handelt es sich um die Verknüpfung des 3'-Hydroxyendes mit dem 5'-Phosphatende eines oder mehrerer DNA Fragmente durch das Enzym Ligase. Diese Technik wurde genutzt um Fusionen eines Vektors mit einem PCR Fragment zu erstellen. Hierzu wurde die 5'-Phosphat Gruppe des linearisierten Vektors zuvor durch 1 U/ μ g DNA Antarktische Phosphatase (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) beseitigt, um Religationen des Vektors zu verhindern. Dieser Schritt erfolgte direkt nach der Restriktion für 30 min bei 37 °C. Die Ligation erfolgte mittels der T4 DNA Ligase (MBI Fermentas) laut Anleitung des Herstellers.

2.6.9 Ortsgerichtete Mutagenese des *L. major hemG*-Gens

Zur Erstellung von ortsgerichteten Punktmutationen in pGEXhemGL wurde das Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) laut Herstellerangaben verwendet. Die benötigten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des NEBaseChanger erstellt und sind in Kapitel 2.3 dargestellt. Die jeweilige Mutation wurde über entsprechende Oligonukleotide mittels PCR eingefügt und die methylierte parentale DNA anschließend durch *DpnI*-Restriktion abgebaut.

2.6.10 DNA Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA Sequenzen, wurden aufgereinigte Plasmide zur partiellen Sequenzierung zu GATC (Konstanz, Deutschland) oder LGC Genomics (Berlin, Deutschland) gesandt.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Rekombinante Produktion und Reinigung von *L. major* HemG

Zwei mal 500 mL steriles LB Medium versetzt mit 100 µg/mL Amp in 1 L Erlenmeyerkolben wurden mit je 5 mL einer Vorkultur von *E. coli* OverExpress^(tm)C43(DE3), in welche zuvor pET32ahemGL transformiert wurde, beimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 0.6 - 0.8 bei 37 °C und 180 rpm kultiviert, bevor die Induktion mit 500 µM IPTG erfolgte. Nach Induktion erfolgte eine weitere Inkubation für 3.5 h bei 37 °C und 180 rpm. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert und das Sediment anschließend über Nacht bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Extraktion der Proteinaggregate (modifiziert nach (Schauer *et al.*, 2003))

Bei exzessiver Proteinsynthese kommt es häufig zur Ansammlung von falsch oder unvollständig gefalteten Proteinen in Proteinaggregaten. Zur Reinigung dieser *L. major* HemG enthaltenden Proteinaggregate wurden die *E. coli* Zellen zunächst aufgetaut und anschließend in 10 mL Lysispuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zelllyse durch Sonifikation (0.5 s Puls, 0.5 s Pause, 70 % Amplitude; KE76; Sonoplus HD 2070, Bandelin (Berlin, Deutschland)). Die Suspension wurde zentrifugiert (35000 x g, 4 °C) und das Sediment zweimal mit 6 mL Isolationspuffer gewaschen, jeweils gefolgt von einer Sonifikation (0.5 s Puls, 0.5 s Pause, 70 % Amplitude; KE76) und Zentrifugation (35000 x g, 4 °C). Abschließend wurde das Sediment in 7 mL 100 mM Tris-Hydrochlorid suspendiert und erneut sonifiziert und zentrifugiert. Die so extrahierten Proteinaggregate wurden in 10 mL Puffer S gelöst.

Lysispuffer:

Tris-Hydrochlorid (pH 8.0)	100	mM
Lysozym	0.2	mg/mL

Isolationspuffer:

Harnstoff	2	M
Tris-Hydrochlorid (pH 8.0)	20	mM
Natriumchlorid	500	mM
Triton-X 100	0.2	% (w/v)

Puffer S:

Guanidinium-HCl	6	M
Tris-Hydrochlorid (pH 8.0)	20	mM
Natriumchlorid	500	mM
β-Mercaptoethanol (β-ME)	5	mM

2.7.3 Renaturierung von *L. major* HemG aus Proteinaggregaten an Nickel-IDA-Sepharose

Zur Abtrennung von unlöslichen Anteilen wurde die in Puffer S gelöste Proteinaggregatsuspension zentrifugiert (35000 x g, 4 °C) und auf 40 mL einer zuvor mit Puffer S äquilibrierten und mit Co^{2+} - beladenen Chelating Sepharose Fast Flow in einer XK26/20 Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen wurde die Matrix mit 80 mL Puffer F mit einer Flussrate von 1 mL/min gewaschen. Die Rückfaltung der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte über einen graduellen Austausch von Puffer F gegen Puffer W über 30 Säulenvolumina bei einer Flussrate von 0.5 mL/min. Abschließend wurden die renaturierten Proteine mit Puffer E eluiert und fraktioniert. Die in den Fraktionen befindlichen Proteine wurden durch Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dargestellt.

Puffer F:

Harnstoff	6	M
Tris-Hydrochlorid (pH 8.0)	20	mM
Natriumchlorid	500	mM
β -ME	5	mM

Puffer W:

Tris-Hydrochlorid (pH 8.0)	20	mM
Natriumchlorid	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)
β -ME	5	mM

Puffer E:

Tris-Hydrochlorid (pH 8.0)	20	mM
Natriumchlorid	500	mM
Imidazol	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)
β -ME	5	mM
CHAPS	0.5	mM

2.7.4 Renaturierung von *L. major* HemG aus Proteinaggregaten durch Dialyse

Die Dialyseschläuche wurden laut Anleitung des Herstellers vorbereitet. Die in Puffer S gelöste Proteinaggregatsuspension wurde in einen Dialysierschlauch gegeben und in 1 L 4 °C kalten Puffers S2 inkubiert. Die Dialyse erfolgte unter langsamem Rühren über einen Zeitraum von 28 h bei 4°C, wobei der Puffer nach 24 h gegen frischen Puffer getauscht wurde. Danach wurde die Proteinaggregatsuspension dem Dialysierschlauch entnommen und die verbliebenen Aggregate bei 4000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Ausschlussgrenze der verwendeten Dialysierschläuche betrug ca. 12 kDa. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden durch SDS-PAGE dargestellt.

Puffer S2:

Tris-Hydrochlorid (pH 8.0)	20 mM
Natriumchlorid	500 mM
β-ME	5 mM

2.7.5 Herstellung zellfreier *L. major* HemG beinhaltender *E. coli* Extrakte

50 mL steriles LB-Medium versetzt mit 100 µg/mL Amp in 100 mL Erlenmeyerkolben wurden mit je 0.5 mL einer Vorkultur von *E. coli* OverExpress^(tm)C43(DE3) Zellen, in welche zuvor pGEXhemGL transformiert wurde, beimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0.9 kultiviert und die Produktion anschließend mit 500 µM IPTG induziert. Nach Induktion erfolgte eine Inkubation von 4 h bei 25 °C und 180 rpm. Das Zellsediment wurde durch Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 4000 x g gewonnen in 10 mL 100 mM Tris-HCl (pH8.0) gelöst und die Zellen wurden mittels FastPrep® Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) bei 6 m/s für 3 x 30 s mechanisch lysiert. Die Suspension wurde für 1 h bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. 2 mL Aliquots des Überstands wurden erstellt und anaerobisiert (Kapitel 2.5.7).

2.7.6 Reinigung von *B.subtilis* YtpQ

Ein Liter steriles LB Medium versetzt mit 100 µg/mL Amp zu je 50 mL Portionen in 100 mL Erlenmeyerkolben wurden mit je 0.5 mL einer Vorkultur von *E. coli* BL21(DE3), in welche zuvor pTrcHisA-ytpQ_{B.s.} transformiert wurde, beimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 0.6 - 0.8 bei 37 °C und 180 rpm kultiviert, bevor die Induktion mit 500 µM IPTG erfolgte. Nach Induktion erfolgte eine weitere Inkubation für 3 h bei 25 °C und 180 rpm. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert und das Pellet über Nacht bei -20 °C gelagert.

2.7.7 Affinitätschromatographische Reinigung von *B.subtilis* YtpQ mittels Nickel-IDA-Sepharose

Zur Aufreinigung von *B.subtilis* YtpQ wurde eine Affinitätschromatographische Reinigung über den His_{6x}-Tag angewandt. Hierzu wurde eine 6 mL Ni²⁺ Chelating Sepharose Säule zunächst mit 6 Säulenvolumina 100 mM HEPES pH 7.4 äquilibriert. In der Zwischenzeit wurden die YtpQ haltigen Zellen in 100 mM HEPES pH 7.4 suspendiert und mittels FastPrep® Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) bei 6 m/s für 3 x 30 s mechanisch lysiert. Zur Abtrennung von unlöslichen Anteilen wurde die Suspension für 30 min bei 4000 x g, 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Säulenmatrix gemischt und bei 4 °C für 2 h inkubiert. Um ungebundene Anteile zu entfernen wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina 100 mM HEPES pH 7.4 gewaschen. Zur Elution des Proteins wurden nacheinander je ein Säulenvolumen 100 mM HEPES pH 7.4 mit steigenden Imidazolkonzentrationen auf die Säule gegeben. Hierdurch wurde ein Gradient simuliert. Die verwendeten Imidazolkonzentrationen waren 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM und 500 mM. Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen und YtpQ durch SDS-PAGE identifiziert und konzentriert.

2.7.8 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden je nach Volumen der Proteinlösung Vivaspin® 6 Centrifugal Concentrator (bis 6 mL) oder Vivaspin® 15 Turbo Centrifugal Concentrator (bis 15 mL) nach Herstellerangaben genutzt.

2.7.9 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde durch den Bradford Assay (BioRad, Hercules, CA, USA) bestimmt. Hierbei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 Komplexe mit den in der Proteinlösung befindlichen Proteinen, wodurch sich das Absorptionsspektrum von 470 nm nach 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm im Vergleich zur nicht gebundenen Form kann photometrisch vermessen werden und ist direkt proportional zum Proteingehalt der Lösung. Eine Kalibrierungskurve mit 0 - 40 mg/mL Bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt (Abbildung 17).

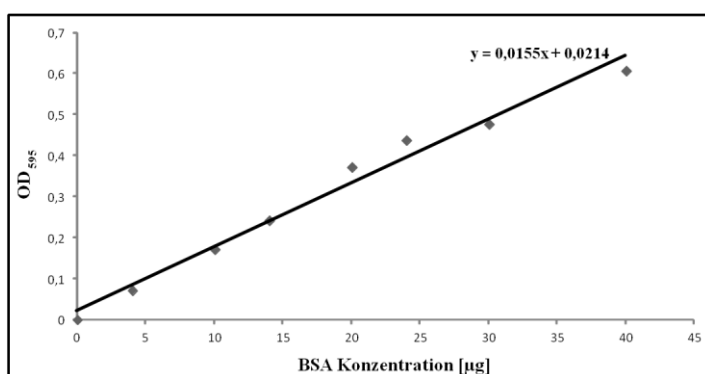


Abbildung 17: BSA Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen.

Die BSA-Konzentration wurde gegen die Absorption bei 595 nm nach Inkubation mit Bradford Reagenz aufgetragen.

2.7.10 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch SDS-PAGE nach der durch Righetti (Righetti, 1990) modifizierten Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) analysiert. Hierbei werden die Proteine zunächst im Sammelgel zu einer distinkten Bande konzentriert und danach im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgrund der angelegten elektrischen Spannung aufgetrennt. Die Proteine wurden zunächst mit SDS Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Danach wurden die Proben auf ein SDS-Gel, welches sich in SDS-Laufpuffer befand, geladen und dieses bei 45 mA laufen gelassen. Als Größenstandart wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) genutzt. Die Gele wurden mit InstantBlue™ (Expedeon, Harston, UK) gefärbt und mit Wasser entfärbt bis die Proteinbanden klar sichtbar waren.

Acrylamid-Stammlösung:

Rotiphorese® Gel (37,5:1), Roth
Bisacrylamid

0,8 % (w/v)

Trenngel (12 % -ig, w/v):

Acrylamid-Stammlösung	2,0	mL
1,5 M Tris-Hydrochlorid (pH 8,8) mit 0,4 % (w/v) SDS	1,25	mL
H ₂ O _{dest}	1,75	mL
APS (10 %)	50,0	µL
TEMED	5,0	µL

Sammelgel (5 % -ig, w/v):

Acrylamid-Stammlösung	500,0	µL
500 mM Tris-Hydrochlorid (pH 6,8) mit 0,4 % (w/v) SD	625,0	µL
H ₂ O _{dest}	1,375	mL
APS (10 %)	25,0	µL
TEMED	2,5	µL

Elektrophoresepuffer:

Glycin	380,0	mM
Tris-Hydrochlorid	50,0	mM
SDS	0,1	% (w/v)

SDS-Probenpuffer:

Tris-Hydrochlorid (pH 6,8)	100,0	mM
Glycerin	40,0	% (v/v)
β-ME	10,0	% (v/v)
SDS	3,2	% (w/v)
Bromphenolblau	0,2	% (w/v)

2.7.11 Bestimmung der Aktivität von *L. major* HemG

Der hier angewandte Enzymassay beruht auf der Umsetzung von Protoporphyrinogen IX (Protogen) zu Protoporphyrin IX (Proto) durch die Protoporphyrinogen IX Oxidase. Hierbei kommt es zu einer Umwandlung des farblosen fluoreszenzinaktiven Protogen in das rötliche fluoreszenzaktive Proto. Proto konnte fluorimetrisch detektiert und somit die Umsetzung bestimmt werden. Die Extinktionswellenlänge betrug 409 nm, die Emissionswellenlänge 633 nm.

Die Fluorimetereinstellung wurde wie folgt gewählt:

Extinktionswellenlänge:	409	nm
Detektionsbereich der Emission:	570 - 680	nm
Scangeschwindigkeit	200	nm/min
Spaltöffnung der Anregungswellenlänge	7	nm

Spaltöffnung der Emissionswellenlänge 7 nm

Eine Eichgerade für das Verhältnis der Fluoreszenzintensität zur Protokonzentration wurde erstellt und ist im folgendem abgebildet (Abbildung 18).

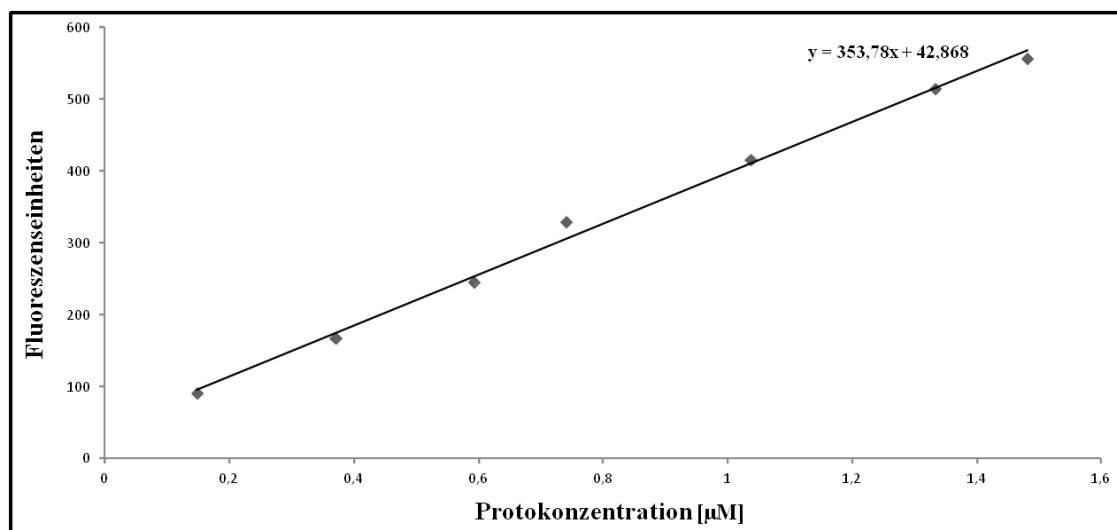


Abbildung 18: Protoporphyrinogen Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung von Proto.

Die Protoporphyrinkonzentration wurde gegen die Fluoreszenz bei 633 nm nach Anregung mit 409 nm aufgetragen.

2.7.11.1 Herstellung des HemG Substrates, Protoporphyrinogen IX

Zur Synthese des für den Assay benötigten Substrats Protoporphyrinogen IX wurde Protoporphyrin IX-chlorid durch 3% -iges Natriumamalgam reduziert. Hierfür wurde zunächst 6 g 3% -iges Natriumamalgam durch Mischung von 5,7 g Quecksilber mit 0,3 g Natrium unter einer Stickstoffatmosphäre dargestellt. Als Substrat der Reduktion dient Protoporphyrin IX. Es wurden ca. 2 mg Proto in 7,5 mL einer 10 mM KOH Lösung durch 20-minütiges Rühren bei Lichtausschluss gelöst. Diese Stocklösung konnte bis zu 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden. 2 mL der Stocklösung wurden in 3 mL der 10 mM KOH Lösung verdünnt. Die Reduktion erfolgte durch Mischen des zuvor abgekühlten und pulverisierten Natriumamalgams mit 3 mL der verdünnten Proto Stocklösung unter Lichtausschluss unter Stickstoffatmosphäre bis zur vollständigen Entfärbung des Substrats. Die genaue Konzentration des zur Reduktion eingesetzten Protos wurde durch folgende Formel über den Millimolaren Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{\text{mM}} = 297 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) bestimmt:

$$c_{(\text{mmol/L})} = \text{OD}/\epsilon \times 100$$

Hierzu wurden 30 µL der verdünnten Proto Stocklösung mit 3 mL einer 2,7 M HCl Lösung versetzt und die Absorbanz bei 408 nm bestimmt. Bei der Berechnung der zum Enzymtest einzusetzenden Konzentration an Protogen wurde von einer vollständigen Umsetzung von Proto zu Protogen ausgegangen. Protogen wurde in 15 µL Portionen bei -80 °C gelagert.

2.7.11.2 Bedingungen des Aktivitätstests

Unter anaeroben Bedingungen wurden in einem 1 mL Ansatz 200 µL zellfreier Extrakt (740 µg Gesamtproteinmasse) bzw. 180 µg homogen gereinigtes *L. major* HemG mit 100 µL 10 x Enzymtestpuffer, Elektronenakzeptoren (10 mM Fumarat, 10 mM Nitrat bzw. 90 µM Ubichinon) und 11 µM Protogen gemischt. Nach dem Start der Reaktion wurde die Bildung von Protoporphyrin IX direkt am Fluoreszenzspektrometer über eine Zeitspanne von 60 min verfolgt.

10x Enzymtestpuffer	Tris-HCl pH 7,6	500,0	mM
	EDTA	10,0	mM
	Glutathion	50,0	mM
	Triton X100	3,0	% (v/v)

2.7.12 Bestimmung der Aktivität von *B. subtilis* YtpQ

Der Enzymassay beruht auf der Umsetzung von Coprogen zu Protogen durch die Coproporphyrinogen III Oxidase. Durch Zugabe von H_2O_2 wird Protogen zu Proto und Coprogen zu Copro oxidiert. Da sowohl Coprogen als auch Protogen fluoreszenzinaktive farblose Substanzen sind ist der Nachweis der Aktivität nur über die zugehörigen Porphyrine möglich, welche durch Zugabe von H_2O_2 generiert wurden. Die Extinktionswellenlänge betrug sowohl für Copro als auch Proto 409 nm während die Emissionswellenlänge für Copro 618 nm und für Proto 633 nm betrug. Anhand der unterschiedlichen Emissionswellenlängen konnten beide Substanzen voneinander getrennt werden.

Die Fluoreszenzspektrometereinstellung wurde wie folgt gewählt:

Extinktionswellenlänge:	409	nm
Detektionsbereich der Emission:	570 - 680	nm
Scangeschwindigkeit	200	nm/min
Spaltöffnung der Anregungswellenlänge	7	nm
Spaltöffnung der Emissionswellenlänge	7	nm

2.7.12.1 Herstellung von Coproporphyrinogen III

Zur Synthese des Substrats Coproporphyrinogen III wurde Coproporphyrin III (Copro) durch 3% -iges Natriumamalgam reduziert. Hierfür wurde zunächst 6 g 3%-iges Natriumamalgam durch Mischung von 5.7 g Quecksilber mit 0.3 g Natrium unter einer Stickstoffatmosphäre dargestellt. Als Substrat der Reduktion diente Coproporphyrin III-chlorid. Es wurden ca. 2 mg Copro in 7.5 mL einer 10 mM KOH Lösung durch 20-minütiges Rühren bei Lichtausschluss gelöst. Diese Lösung bildete die Stocklösung und konnte bis zu 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden. 2 mL der Stocklösung wurden in 3 mL der 10 mM KOH Lösung verdünnt. Die Reduktion erfolgte durch Mischen des zuvor abgekühlten und pulverisierten Natriumamalgam mit 3 mL der verdünnten Copro Stocklösung unter Licht- und Sauerstoffausschluss bis zur vollständigen Entfärbung des Substrats. Der Versuchsaufbau entsprach dem zur Herstellung von Protogen. Die genaue Konzentration des zur Reduktion eingesetzten

Copros wurde über den Millimolaren Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{\text{mM}} = 478 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) bestimmt.

Hierzu wurden 30 μL der verdünnten Proto Stocklösung mit 3 mL einer 2.7 M HCl Lösung versetzt und die Absorbanz bei 401 nm bestimmt. Bei der Berechnung der zum Enzymtest einzusetzenden Konzentration an Coprogen wurde von einer vollständigen Umsetzung von Copro zu Coprogen ausgegangen. Coprogen wurde in 15 μL Portionen bei -80°C gelagert.

2.7.12.2 *Bedingungen des Aktivitätstests*

Für den Standardenzymtest wurden in 1 mL Ansatz 0.64 μg homogen gereinigtes YtpQ, mit 12.5 μM Coprogen in Kinetikpuffer für 30 min bei 37°C , 500 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μL einer 30%-igen Wasserstoffperoxid Lösung beendet. Um eine vollständige Oxidation des Edukts durch H_2O_2 zu gewährleisten wurde das Gemisch für weitere 30 min bei 37°C , 500 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Aktivität und verschiedenen Metallkofaktoren wurde das Enzym YtpQ im Kinetikpuffer vor Zugabe des Substrates mit 10 mM EGTA oder 10 mM EDTA versetzt und für 1 h bei 37°C , 500 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden der Mixtur 10 mM des entsprechenden Metallsalzes hinzugefügt und es folgte eine Inkubation für 3 h bei 37°C , 500 rpm unter Lichtausschluss. Danach erfolgte der Enzymtest wie oben beschrieben. Für den anaeroben Enzymtest wurde das Enzym, sowie der Kinetikpuffer vor dem Test wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben anaerobisiert. Alle weiteren Schritte des Assays wurden in einer aneroben Kammer durchgeführt.

Kinetikpuffer	MES / HCl (pH 6)	50,0	mM
	Triton X-100	0,1	% (w/v)

2.7.13 Chromatographische Porphyrinauftrennung mittels Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die chromatographische Porphyrinauftrennung wurden die entsprechenden Zellen analog der für die Wachstumskinetiken (Kapitel 2.5.4) beschriebenen Kulturen angesetzt und für 17 h, 37°C , 200 rpm kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen für 30 min bei $4000 \times g$, 4°C zentrifugiert und das Nassgewicht des Sediments bestimmt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 in 50 mM Tris-Hydrochlorid pH 8.0 + 2 % Tween 80 resuspendiert. 300 μL der Suspension wurden in 2 mL Reaktionsgefäße mit einem entsprechenden Anteil an Lysis Matrix überführt und die Zellen mittels des FastPrep® Instrument bei 6 m/s für $2 \times 30 \text{ s}$ mechanisch lysiert. Nach Aufschluss der Zellen wurden diese mit 10 μL konz. HCl versetzt, 600 μL eines Aceton/HCl (konz.) Gemisches (97.5:2.5) hinzugegeben und die Mixtur zur Extraktion der Porphyrine für 10 min bei 4°C stark geschüttelt. Zur Abtrennung aller unlöslichen Teile wurde die Suspension für 20 min bei $12,000 \times g$, 4°C zentrifugiert. 200 μL des Überstandes wurden in HPLC Gefäße überführt. Die extrahierten Tetrapyrrole wurden mittels der Jasco 200er HPLC Serie (Jasco Groß Umstadt, Deutschland) mit Hilfe einer Equisil BDS C18 Säule (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) mit

5 µm Partikeldurchmesser und 250 mm × 4.6 mm Säulengröße bei 30 °C analysiert. Die Tetrapyrrole wurden mittels photometrischen Dioden Array im Bereich von 200 - 650 nm und mittels Fluoreszenzmessung mit einer Extinktionswellenlänge von 409 nm bei einer Emissionswellenlänge von 630 nm detektiert. Es wurden jeweils 20 µL Probe injiziert und eine graduelle Methode mit einer Flussrate von 0.5 mL /min gewählt, wobei der Gradient aus veränderlichen Zusammensetzungen von Laufmittel A (1M Ammoniumacetat pH 5.2), Laufmittel B (100 % Methanol) und Laufmittel C (100 % Acetonitril) bestand. Der Verlauf des Gradienten ist Abbildung 19 zu entnehmen. Protoporphyrin, Hämin und Coproporphyrin wurden als Standard genutzt und die unbekannten Porphyrine wurden anhand der Retentionszeiten dieser identifiziert.

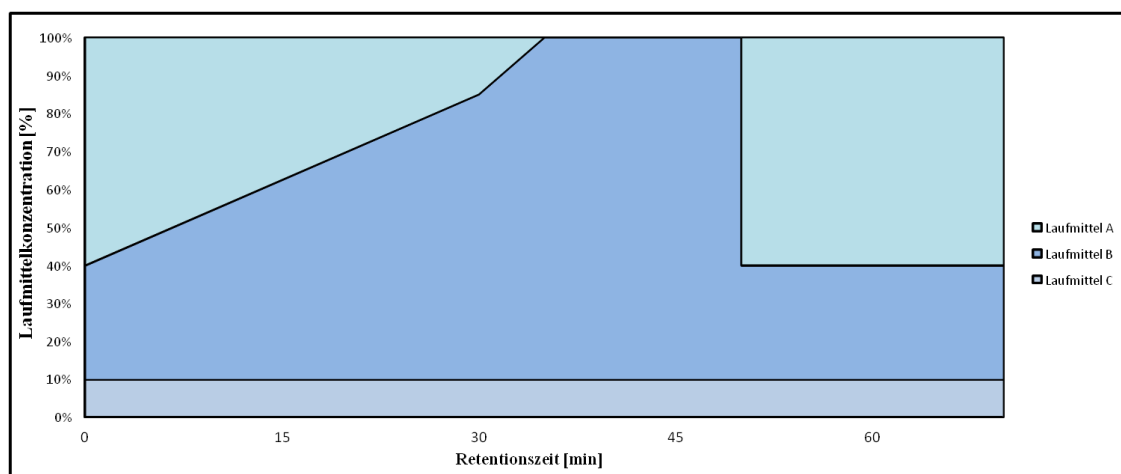


Abbildung 19: Verlauf des HPLC-Gradienten.

Die Retentionszeit wurde gegen den prozentualen Anteil der Laufmittel aufgetragen. Laufmittel A: 1M Ammoniumacetat pH5.2; Laufmittel B: Methanol ; Laufmittel C: Acetonitril

2.7.14 Identifizierung des Flavin Kofaktors mittels HPLC

Zur Bestimmung des Flavin Kofaktors von *L. major* HemG wurde das gereinigte Protein durch Zugabe von 5 % (v/v) Perchloressigsäure präzipitiert und bei 12'000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde mittels der Jasco 1500er HPLC Serie (Jasco, Gross Umstadt, Deutschland) analysiert. Die Flavine wurden auf einer ODS Hypersil 250 x 4.6 mm Säule (Techlab, Erkerode, Deutschland) separiert. Es wurde eine isokratische Methode mit einer Flussrate von 0.5 mL/min bei 30 °C gewählt, wobei das Laufmittel aus einem Gemisch von Acetonitril: Wasser: Trifluorsäure: 75 % Phosphorsäure im Verhältnis 14: 84.41: 1.5: 0.09 bestand. Flavine wurden durch Messung der Fluoreszenz mit einer Extinktions Wellenlänge von 430 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm detektiert. Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) wurden als Standard genutzt und das unbekannte Flavin anhand der Retentionszeit bestimmt.

2.8 Bioinformatische Methoden

2.8.1 Datenbanksuche mit BLAST

BLAST steht für „Basic Local Alignment Search Tool“ und bezeichnet einen Algorithmus zur Analyse biologischer Sequenzdaten (Altschul *et al.*, 1990). In dieser Arbeit wurde BLAST zur Analyse von Aminosäuresequenzen genutzt. Hierbei wird die eingegebene Sequenz zunächst in kleiner n-Mere zerlegt, welche auf Sequenzidentität hin in einer Sequenzdatenbank untersucht werden. Finden sich Homologien, so werden diese n-Mere schrittweise verlängert und der Ähnlichkeitsgrad der Sequenz mit der gesuchten Sequenz statistisch bewertet. Als Ergebnis wird eine Liste aller ähnlichen Sequenzen mit einer statistischen Auswertung des Ähnlichkeitsgrades zur gesuchten Sequenz erstellt. Es wird zudem ein Erwartungswert ausgegeben, welcher der Anzahl an zufällig gefundenen Sequenzen mit gleicher Übereinstimmung entspricht. Es gilt, je kleiner der Erwartungswert umso signifikanter die Übereinstimmung der ausgegebenen Sequenzen. Zudem werden die Identität und die Übereinstimmung der abgefragten Sequenzen (Query Coverage) angegeben. Hierbei bestimmt die Identität wie viele Aminosäuren in der verglichenen Sequenz identisch sind und die Query Coverage welcher Prozentsatz der Sequenz mit der Ausgangssequenz verglichen wird. Analysen von Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Servers des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) erstellt oder mit eigens angelegten Datenbanken im Falle des differenziellen Genomvergleichs.

2.8.2 Computer gestützter Genomvergleich

Durch den differenziellen Genomvergleich sollten Gene gefunden werden, welche in einer Referenzgruppe vorhanden sind in einer zweiten jedoch nicht. Er basierte auf einem BLAST-Algorithmus. Zunächst wurden die beiden Gruppen bestimmt.

Zu Gruppe A gehörten die Genome von:

Acidovorax sp. JS42,
Acinetobacter sp. ADP1,
Azotobacter vinelandii,
Burkholderia mallei NCTC 10247,
Campylobacter curvus 525 92,
Dinoroseobacter shibae DFL 12,
Ehrlichia canis Jake,
Legionella pneumophila Corby,
Neisseria meningitides 053442,
Pseudomonas aeruginosa PAO1,
Rickettsia rickettsii Iowa,
Roseobacter denitrificans OCh,
Sphingomonas wittichii RW1,
Stenotrophomonas maltophilia K279a,
Xylella fastidiosa Temecula1,
Zymomonas mobilis ZM.

Zu Gruppe B die Genome von:

Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 3 JL03,
Aspergillus fumigates,

Bacillus anthracis Ames,
Chlamydia trachomatis A HAR 13,
Escherichia coli MG1655.

Zunächst wurde ein Shell Skript in Bash erstellt um die einzelnen Genome zu je einer Datei zu verketteten und für beide Gruppen eine BLAST Datenbank zu erstellen. Wobei die Nomenklatur der Gene der von *P. aeruginosa* entsprach. Anschließend wurden mittels BLAST all diejenigen Gene innerhalb von Gruppe A gesucht welche hohe Homologien (e-Value 10^{-5}) aufwiesen. Hieraus wurde eine FASTA-Datei erstellt. Diese wurde im folgendem durch BLAST mit den Genomen aus Gruppe B verglichen und es wurden all die Gene herausgefiltert welche nicht in Gruppe B vorkamen. Dieser 2. Abgleich gegen Gruppe B wurde auch sequenziell durchgeführt, wobei zunächst nur gegen das Genom von *E. coli* verglichen wurde. Anschließend wurde gegen die Genome von *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae*, sowie gegen die Genome von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *B. subtilis* verglichen. Alle BLAST abfragen wurden mit R erstellt.

2.8.3 Protein Alignment mittels Strap

Protein Alignements wurden mit der Strap Software durchgeführt. Dies ist ein Programm von Christoph Gille für sequenz- und strukturbasierte Vergleiche von Proteinen. Die Alignments wurden mit Hilfe des Clustal-W Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994) des Programms erstellt.

2.8.4 Vorhersage von Proteinmodellen

Homologie Modellierungen von Proteinstrukturen wurden mittels Swissmodel (Biasini *et al.*, 2014) im Alignment Mode durchgeführt. *Ab Initio* Modellierungen wurden mittels QUARK (Xu und Zhang, 2012) erstellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Analyse der Vielzahl sequenzierter mikrobieller Genome auf die Präsenz bekannter Biosynthesewege und zugehöriger Enzyme zeigte für einige Organismen, dass Enzyme einiger der Syntheseschritte fehlen. Daraus wurden neue unbekannte Enzymtypen für diese Schritte postuliert. Das erste Beispiel, dass in dieser Arbeit experimentell bearbeitet wurde war die Protoporphyrinogen IX Oxidase von *P. aeruginosa*. Diese sollte durch Komplementation eines PPO-defizienten *E. coli* Stammes mit einer *P. aeruginosa* Genbank identifiziert werden. Hierzu war zunächst die Wahl der richtigen *E. coli* Mutante von entscheidender Bedeutung.

3.1 Charakterisierung des Phänotyps von zwei *hemG* defizienten *E. coli* Mutanten

Es gibt typischerweise zwei *hemG* defiziente *E. coli* Stämme, die für Komplementationsstudien eingesetzt werden. Zum einen die chemische Mutante *E. coli* SASX38 (Sasarman *et al.*, 1979) zum anderen *E. coli* LG285 (Narita *et al.*, 1999), bei welcher *hemG* durch eine Kanamycinresistenzkassette ersetzt wurde. Im folgendem wurden beide Stämme zunächst hinsichtlich ihrer Wachstumsraten im Vergleich mit einem korrespondierenden *E. coli* Wildtyp Stamm in Flüssigmedium unter Einfluss des Hämanalogons Hämin untersucht (Abbildung 20 und Abbildung 21).

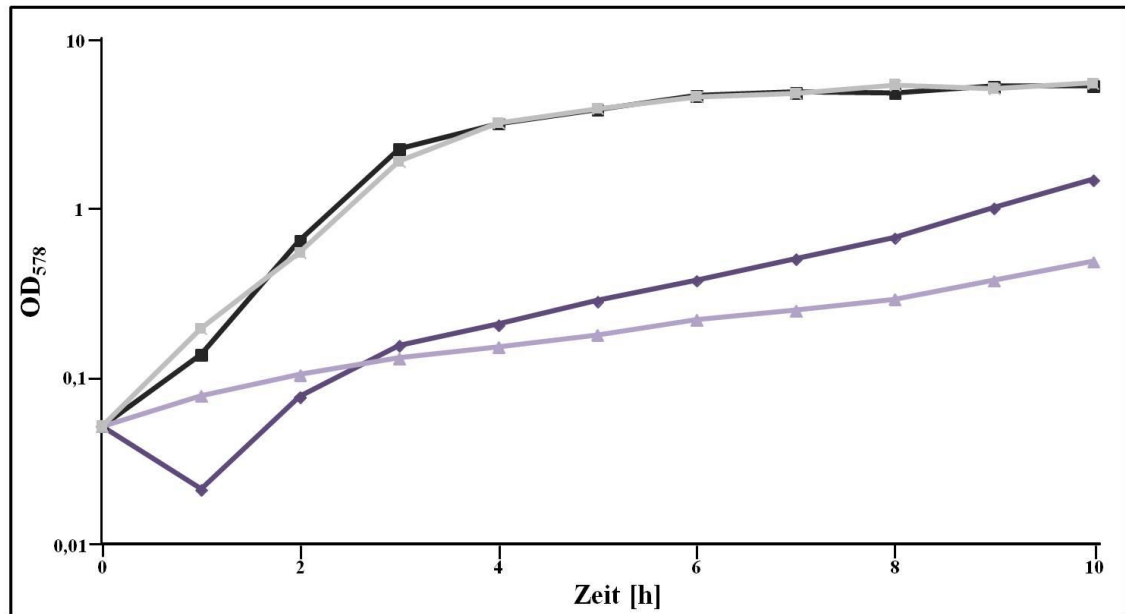


Abbildung 20: Wachstum der $\Delta hemG$ Mutante *E. coli* LG285 in Abhängigkeit von Hämin.

Die Veränderung der optischen Dichte bei 578 nm wurde über die Zeit aufgetragen. Wachstumskurven wurden wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben durchgeführt. ◆: *E. coli* LG285 + 50 µg/mL Hämin; ▲: *E. coli* LG285; ■: *E. coli* K12 + 50 µg/mL Hämin; ■: *E. coli* K12

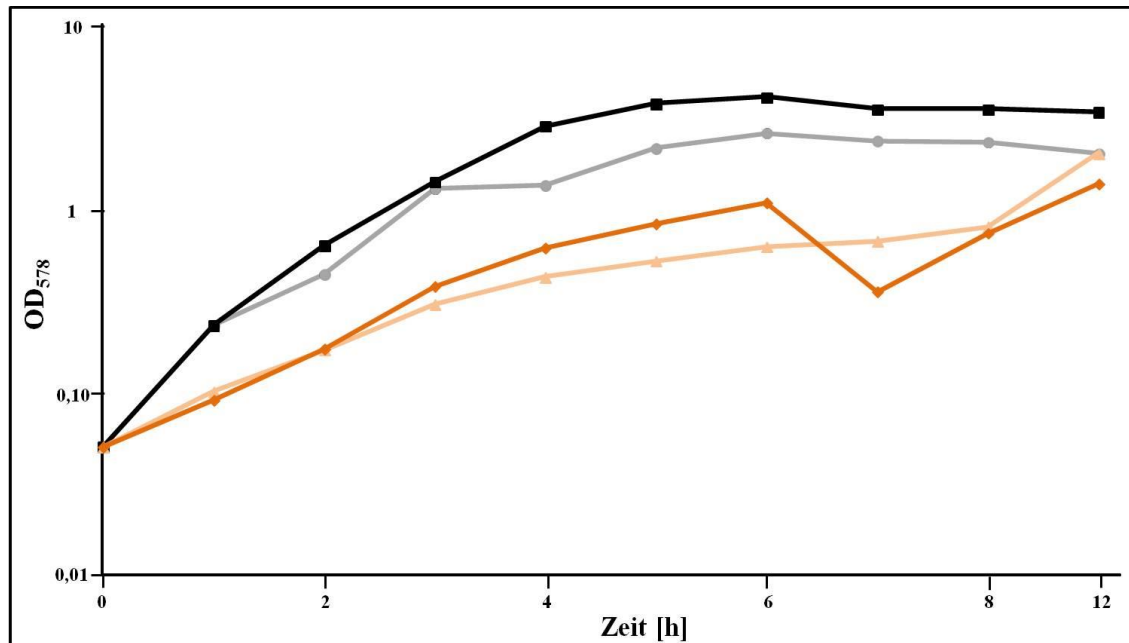


Abbildung 21: Wachstum der $\Delta hemG$ Mutante *E. coli* SASX38 in Abhängigkeit von Hämin.

Die Veränderung der optischen Dichte bei 578 nm wurde über die Zeit aufgetragen. Wachstumskurven wurden wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben durchgeführt. ◆: *E. coli* SASX38 + 50 µg/mL Hämin; ▲: *E. coli* SASX38; ●: *E. coli* DH10B + 50 µg/mL Hämin; ■: *E. coli* DH10B

Beide Stämme wiesen ein vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp auf. Zudem sank das Wachstum der *E. coli* SASX38 *hemG* Mutante bei Zugabe von Hämin im Medium gering (Abbildung 21), während sie bei *E. coli* LG285 stieg (Abbildung 20). Optisch war bei *E. coli* LG285 nach 24 Stunden eine milchige Trübung und deutliche Rotfärbung des Mediums erkennbar, welches in Abbildung 22 dargestellt ist.

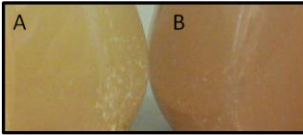


Abbildung 22: Akkumulation von Porphyrinen während des Wachstums des *ΔhemG*-Stammes *E. coli* LG285.

Dargestellt sind Flüssigkulturen nach 48 h Wachstum. A: mit *E. coli hemG* komplementierten Mutante; B: *E. coli* LG285 pCDF-Duet-1

Dies deutete auf eine Lysis der Zellen mit gleichzeitiger Freisetzung von Porphyrinen hin. Auf Festmedien wuchsen beide Stämme in kleinen Kolonien, welche bei Inkubationen von mehr als 24 Stunden eine rötliche Färbung aufwiesen, die typisch für in der Häm-Biosynthese gehemmte *E. coli* Zellen ist (Sasarman *et al.*, 1979). Somit wiesen beide Stämme einen eindeutigen Wachstumsphänotyp auf, wobei dieser aufgrund der Rotfärbung des Flüssigmediums optisch deutlicher bei *E. coli* LG285 war. Die Wachstumsexperimente legten die Entscheidung für *E. coli* LG285 nahe.

Neben einem distinkten Wachstumsphänotyp war jedoch auch die Stabilität von Plasmiden innerhalb der Mutanten für die Wahl des Modellstammes von entscheidender Bedeutung. Hierzu wurden verschiedene Plasmide, welche sich zum einen in ihrem Replikationsursprung und zum anderen in ihrer Antibiotikaresistenz unterschieden, in die zwei *ΔhemG* defizienten *E. coli* Stämme eingebracht. Anschließend wurden beide Stämme auf ihr Vermögen auf Selektionsplatten zu wachsen hin getestet. Verwendet wurden die Plasmide pCDF-Duet-1 mit CloDF13 Replikationsursprung und Streptomycinresistenz, pACYC-Duet-1 mit p15A Replikationsursprung und Chloramphenicolresistenz, pGEX-6P-1 mit pBR322 Replikationsursprung und Ampicillinresistenz sowie pET-Duet-1 mit ColE1 Replikationsursprung und Ampicillinresistenz. *E. coli* SASX38 konnte ausschließlich mit pCDF-Duet-1 auf entsprechenden Selektionsplatten wachsen. Dabei schien es, dass einzig der CloDF13 Replikationsursprung eine hohe segregative Stabilität in diesem Stamm aufwies. Dies könnte auf einen Defekt in einem der DNA-Transferegene *traC*, *traD*, *traI*, *traM* oder *traY* schließen lassen. TraD ist dafür bekannt, notwendig für die Weitergabe von ColE1 basierten Plasmiden, jedoch nicht von CloDF13 basierten Plasmiden zu sein (Willetts, 1980). In *E. coli* LG285 blieben alle getesteten Plasmide stabil über mehrere Replikationszyklen integriert.

Da *E. coli* LG285 Plasmide stabil replizieren konnte und einen eindeutigen Wachstumsphänotyp aufwies, wurde dieser Stamm für alle zukünftigen Komplementationsstudien genutzt.

Zusätzlich zu der Fähigkeit Plasmide stabil zu replizieren und einen eindeutigen Wachstumsphänotyp aufzuweisen, war eine dritte Eigenschaft von entscheidender Bedeutung bei der Wahl eines Komplementationsstammes: die Selektierbarkeit auf festen Medien. Hierbei wurde ein Medium gesucht, auf welchem die Mutante nur nach erfolgter Komplementation wachsen konnte, oder zumindest einen eindeutig selektierbaren Phänotyp auf diesem Medium aufzeigte. Es wurden verschiedene Voll- und Minimalmedien mit unterschiedlichen Zusätzen getestet (Kapitel 2.4.1).

Einzig auf M9-Medium mit Vitamin B1 (1µg/mL), Eisenchlorid und ALA (0.5 µg/mL) sowie einer Zugabe von Glucose konnte Wachstum des komplementierten *E. coli* LG285 Stammes stabil erfolgen. Aufgrund der Tatsache, dass das Wachstum mit einem Zusatz von 0.8 % Glucose schon nach zwei Tagen erfolgte, wurde dieser Ansatz für die weiteren Versuche genutzt.

3.2 Untersuchungen zur Identifikation der unbekannten PPO aus *P. aeruginosa*

Ein Enzym, welches häufig im bekannten Häm-Biosynthesewege der Bakterien fehlt ist die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO), die den vorletzten Schritt der Häm-Synthese, die Oxidation von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX katalysiert. Für dieses Enzym ist auch in der Häm-Biosynthese von *P. aeruginosa* bisher kein bekannter Vertreter gefunden worden (Boynton *et al.*, 2011). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche PPO durch eine klassische Komplementationstrategie eines PPO-defizienten *E. coli* Stammes ermittelt werden.

3.2.1 Komplementationsstudien von *E. coli hemG* mit *Synechocystis* sp. *hemJ*

Im Jahre 2010 wurde das Gen *slr1790* aus *Synechocystis* sp. PCC6803 kodierend für eine neue PPO postuliert. Dieses wurde später zu *hemJ* umbenannt (Kato *et al.*, 2010). Interessanterweise wurde 2011 ein Artikel von Boynton *et al.* veröffentlicht, in dem vergleichende Genomanalysen verschiedener Organismen darauf hindeuteten, dass *hemJ* in einem Großteil der Organismen vorkommt, welche weder *hemG* noch *hemY*, die zwei bekannten PPO-kodierenden Gene, besitzen (Boynton *et al.*, 2011). Zu diesen Organismen zählt auch *Pseudomonas aeruginosa*. Es zeigte sich jedoch, dass die PPO Aktivität für *Synechocystis* sp. PCC6803 HemJ nicht eindeutig nachweisbar war, da eine *hemJ* Mutante zwar durch ein anderes PPO-kodierendes Gen komplementiert

werden konnte, dies aber andersherum nicht funktionierte. Deshalb wurden die beschriebenen Effekte mit einer Chaperonfunktion von HemJ oder, beispielsweise einer Teilfunktion als Membrananker der PPO, begründet (Boynton *et al.*, 2011). Es wurde dennoch zunächst versucht, die *hemG*-defiziente *E. coli* Mutante LG285 mit *hemJ* aus *Synechocystis* sp. PCC6803 optimiert für *E. coli* Codon Gebrauch zu komplementieren (Abbildung 23).

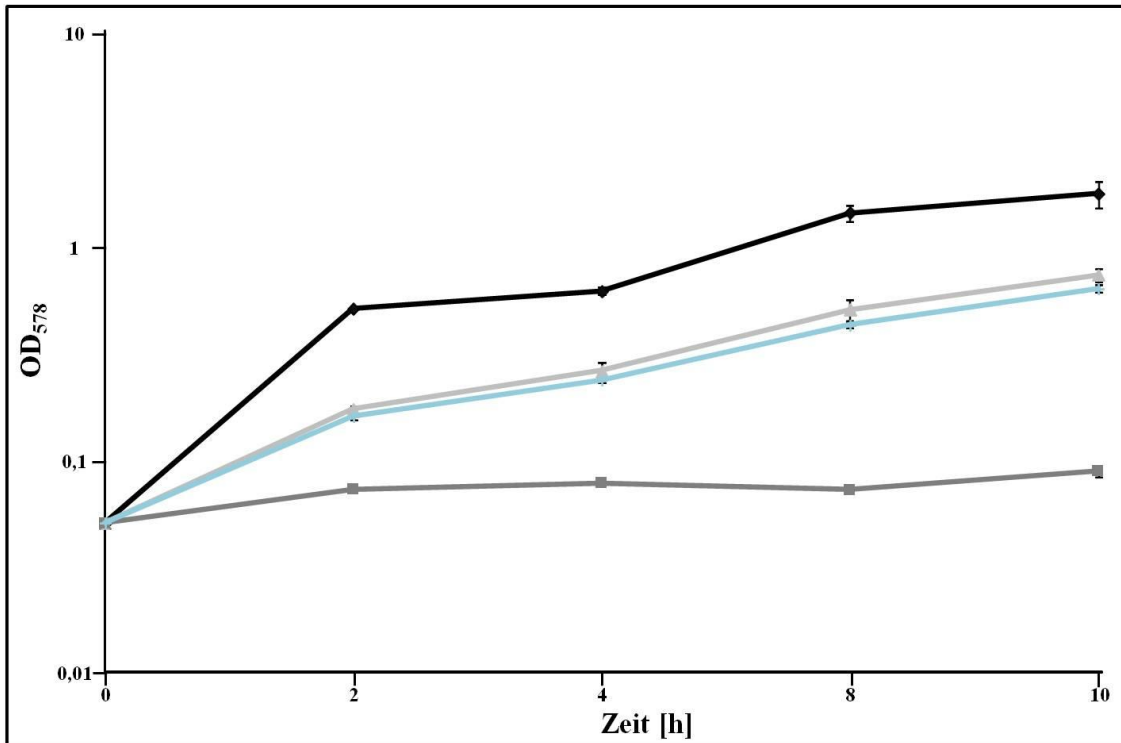


Abbildung 23: Wachstumskinetik der $\Delta hemG$ Mutante *E. coli* LG285 komplementiert mit *hemJ*. Die Veränderung der optischen Dichte bei 578 nm wurde über die Zeit aufgetragen. Wachstumskurven wurden wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben durchgeführt. ■ : *E. coli* LG285 pGEX-6P-1; ▲ : *E. coli* LG285; ◆ : *E. coli* K12; + : *E. coli* LG285 pGEXhemJ.

Das Wachstum der Mutante wurde durch die Komplementation leicht verbessert (Abbildung 23), jedoch nicht annähernd so stark wie mit dem *E. coli hemG*-Gen. Um festzustellen, ob die gefundenen Veränderungen im Wachstumsverhalten auf eine wiederhergestellte Häm-Biosynthese und somit auf eine funktionsfähige PPO zurückzuführen waren, wurden Häm sowie dessen Vorläufermoleküle extrahiert und chromatographisch aufgetrennt. Hierfür wurde eine Reversed Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Gradienteneluierung angewandt, bei der polare Stoffe zuerst eluiert wurden. UV/Vis Chromatogramme wurden mittels photometrischem Dioden Array im Bereich von 200 - 650 nm aufgenommen um Häm nachzuweisen und Chromatogramme der Fluorophore bei einer Emmisionswellenlänge von 630 nm nach Anregung bei 409 nm um Porphyrine zu detektieren. Durch die in

Kapitel 2.7.13 beschriebene Extraktion wurden die sauerstofflabilen Porphyrinogene in die entsprechenden Porphyrine umgesetzt. Hieraus folgte, dass Protoporphyrinogen IX (Proto) und Protoporphyrin IX (Proto) sowie Coproporphyrinogen III (Coprogen) und Coproporphyrin III (Copro) nicht voneinander unterschieden werden konnten.

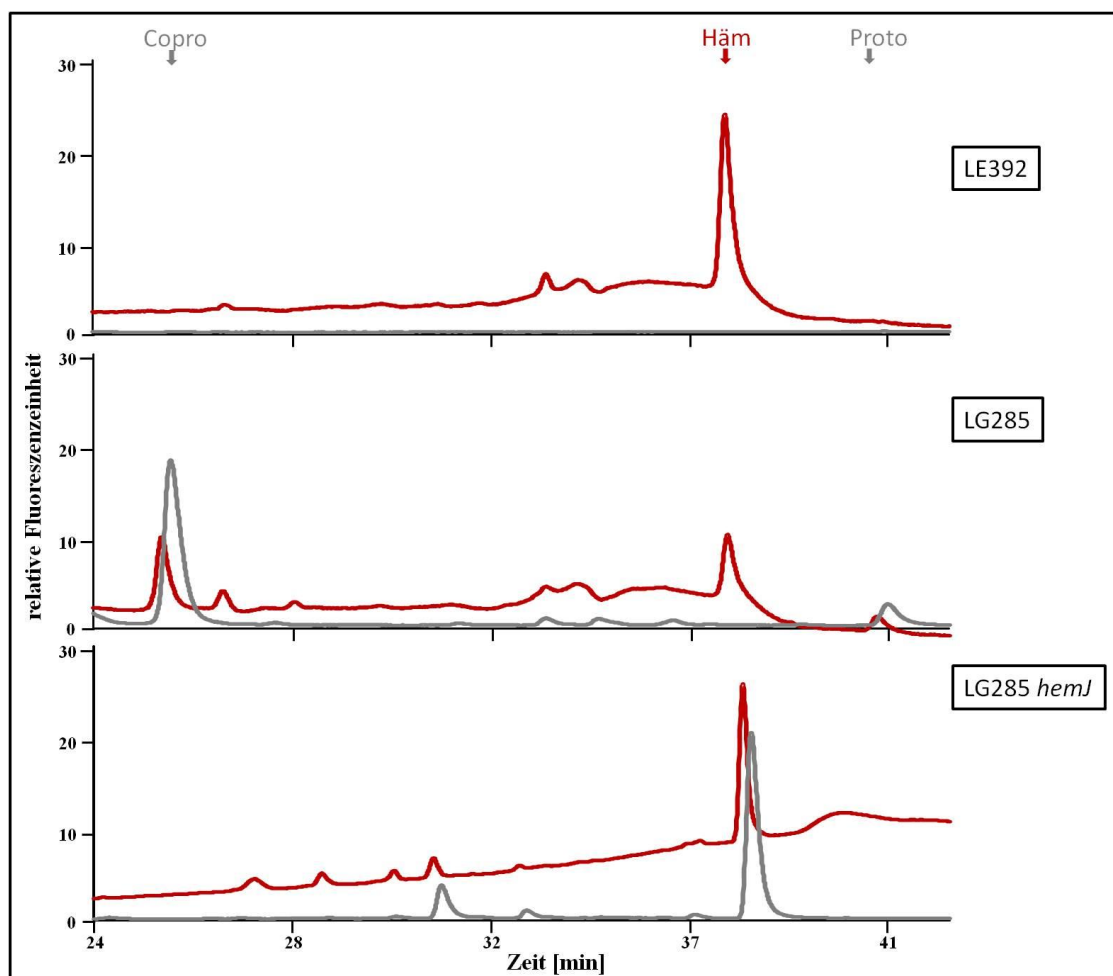


Abbildung 24: HPLC-Analyse der Porphyrinzusammensetzung von *E. coli* LG285 *hemJ*.

HPLC Analysen und Porphyrinaufbereitung wurden durchgeführt wie in Kapitel 2.7.13 beschrieben. Aufgetragen ist die Signalstärke gegen die Zeit in Minuten. Retentionszeit für Häm war 37.3 min., für Proto 40.7 min. und 25.6 min für Copro. Rot:UV/Vis-Chromatogramm; Grau: Fluoreszenzschromatogramm bei 630 nm nach Anregung mit 409 nm.

In der Auswertung der Chromatogramme (Abbildung 24) zeigte sich eine eindeutige Akkumulation der Vorläufermoleküle und nur ein geringer Anteil an Häm in der Probe für die nicht komplementierte Mutante. Im Gegensatz hierzu zeigte der Wildtyp keine Vorläufermolekül-Akkumulation, dafür allerdings eine Häm-Akkumulation. Erstaunlicherweise unterschied sich die mit *hemJ* komplementierte Mutante von diesen Chromatogrammen stark, da sie ein starkes Signal mit einer Retentionszeit direkt nach Häm aufwies. Bei diesem kann es sich allerdings nicht um eine Häm-Akkumulation handeln, da es sich um eine fluoreszenzaktive Substanz handelte.

3.2.2 Komplementation der *E. coli hemG* Mutante mit *P. aeruginosa hemJ* und einer *P.aeruginosa* Genbank

Die bisher erzielten Resultate führten zu der Überlegung, dass *hemJ* nur für einen Teil einer bisher unbekannten PPO kodiert. Um diese zu identifizieren wurde *hemJ* in pGEX-6P-1 in *E. coli* LG285 transformiert und dieser dann für Komplementationsstudien mit einer *P. aeruginosa* Genbank genutzt. Hierbei war das Rückgrat jedes Cosmids innerhalb der Bank pLAFR3, in welchem Fragmente von ca. 25 kb einer partiell verdauten *P. aeruginosa* ATCC 17933 DNA über die *Bam*HI Schnittstelle eingebracht wurde. Die so gewonnenen Cosmide trugen eine Tetrazyclin-Resistenz und einen RK2 Replikationsursprung (Schobert und Gorisch, 1999). Nach Transformation von *E. coli* LG285 pGEX-6P-1*hemJ* mit der Genbank wurden die Zellen auf den Komplementationsplatten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Nach neun Tagen hatten sich insgesamt 85 Kolonien gebildet. Diese wurden anschließend auf Komplementations-Platten, welche zusätzlich Kanamycin enthielten, überführt um etwaige Kontaminationen auszuschließen. Hierdurch konnte die Zahl der Kolonien auf 61 eingeschränkt werden. Diese wurden anschließend in flüssigem LB Medium für 48 h herangezogen um den Farbumschlag bei nicht Komplementation zu beobachten, und somit eine weitere Komplementationskontrolle durchzuführen. Aus dieser Kontrolle gingen zwei Stämme hervor welche möglicherweise die bisher unbekannte PPO trugen. Sie wurden *E. coli* LG285 Cosmid54 und *E. coli* LG285 Cosmid49 genannt. Von den Stämmen *E. coli* LG285 Cosmid54 und *E. coli* LG285 Cosmid49 wurden die Porphyrine extrahiert und *via* HPLC chromatographisch aufgetrennt. Es waren jedoch keinerlei Porphyrine im Extrakt nachweisbar. Da eine Sequenzierung der Cosmide fehlschlug, wurde die Komplementationsstudie wiederholt. Zunächst konnten keine erneuten Kolonien generiert werden, sodass der Versuch ein weiteres Mal in einem Doppelansatz mit einer *Azotobacter vinelandii* Genbank in pUC18 wiederholt wurde. Diese Genbank konnte genutzt werden, da davon ausgegangen wird, dass es sich sowohl in *Azotobacter vinelandii* als auch in *Pseudomonas aeruginosa* um die gleiche PPO handelt. Die Ansätze unterschieden sich, indem in Ansatz A zusätzlich zur Genbank *hemJ* in *E.coli* LG285 eingebracht wurde in Ansatz B jedoch nicht. Es konnten insgesamt 3 Kolonien, eine in Ansatz A und zwei in Ansatz B, ausgemacht werden, welche möglicherweise die unbekannte PPO trugen. Sie wurden *E.coli* LG285 B13, *E.coli* LG285 C6 und *E.coli* LG285 C12 genannt. Von allen drei

Stämmen wurden die Porphyrine extrahiert und chromatographisch getrennt. Ein Chromatogramm von *E.coli* LG285 C6 ist exemplarisch für die Chromatogramme aller drei Isolate in Abbildung 25 dargestellt.

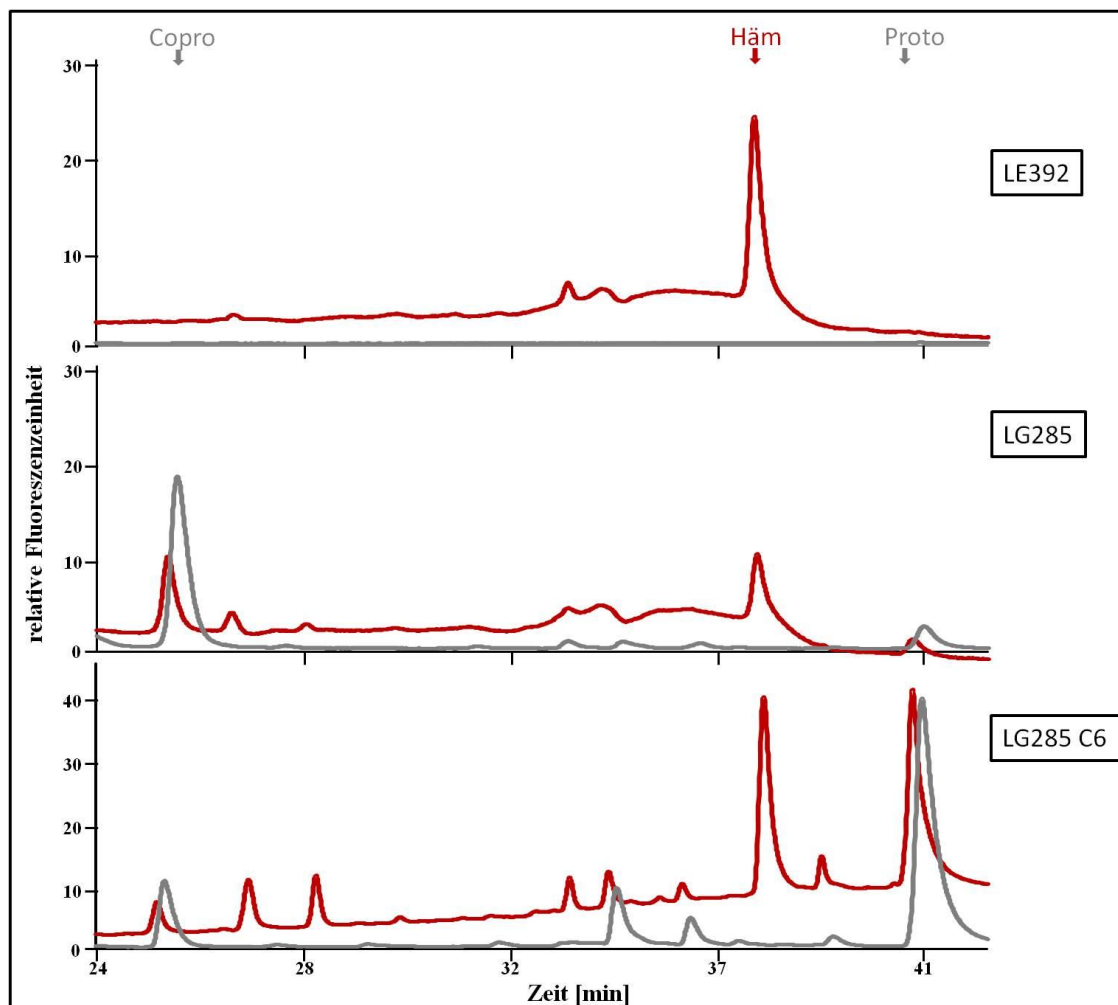


Abbildung 25: HPLC-Analyse der Porphyrinzusammensetzung von *E. coli* LG285 C6.

HPLC Analysen und Porphyrinaufbereitung wurden durchgeführt wie in Kapitel 2.7.13 beschrieben. Aufgetragen ist die Signalstärke gegen die Zeit in Minuten. Retentionszeit für Häm war 37.3 min., für Proto 40.7 min. und 25.6 min für Copro. Rot:UV/Vis-Chromatogramm; Grau: Fluoreszenzschromatogramm bei 630 nm nach Anregung mit 409 nm.

Alle drei Stämme wiesen jedoch eine starke Akkumulation von Vorläufermolekülen auf, welche auf eine nicht erfolgte Komplementation hindeuten. Die zusätzlich verstärkte Akkumulation an Häm in den Proben, könnte eher auf eine Isolation einer zusätzlichen Ferrochelatase hindeuten als auf die Vervollständigung der Häm-Biosynthese durch eine neuartige PPO. Die Sequenzierung ergab jedoch, dass es sich bei allen Isolaten um pUC18 Vektoren ohne Insert handelte.

3.2.3 Untersuchungen zur Identifikation der unbekannten PPO aus *P. aeruginosa* mittels differentiellen Genomvergleich

Die Komplementation Studien führten nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, daher wurde ein bioinformatischer Ansatz verfolgt. Die Grundidee dessen war es, die Genome von *hemJ* tragenden Organismen mit solchen von *hemJ* nicht tragenden Organismen zu vergleichen. Hierzu wurden zunächst Organismen, die zu einer der beiden Gruppen gehören identifiziert. Zur Gruppe der *hemJ* habenden Organismen zählten *Acidovorax* sp. JS42, *Acinetobacter* sp. ADP1, *Azotobacter vinelandii*, *Burkholderia mallei* NCTC 10247, *Campylobacter curvus* 525 92, *Dinoroseobacter shibae* DFL 12, *Ehrlichia canis* Jake, *Legionella pneumophila* Corby, *Neisseria meningitides* 053442, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Rickettsia rickettsii* Iowa, *Roseobacter denitrificans* OCh, *Sphingomonas wittichii* RW1, *Stenotrophomonas maltophilia* K279a, *Xylella fastidiosa* Temecula1 und *Zymomonas mobilis* ZM4. Diese Gruppe wurde fortan als Gruppe A bezeichnet. Zur anderen Gruppe, welche als Gruppe B benannt wurde, gehörten *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 3 JL03, *Aspergillus fumigates*, *Bacillus anthracis* Ames, *Chlamydia trachomatis* A HAR 13 und *Escherichia coli* MG1655. Innerhalb der zweiten Gruppe war die PPO bekannt. Anfangs wurde aus Genomen von Gruppe A eine Datenbank erstellt und über eine BLAST-Analyse alle Gene herausgefiltert, welche in allen zur Gruppe A gehörenden Organismen vorhanden waren. Diese wurden zur Vereinheitlichung nach den zugehörigen Genen aus *P. aeruginosa* benannt. Diese Gene wurden nun mit Genen aus Gruppe B verglichen und es wurden all diejenigen herausgefiltert, welche nicht in den Genomen von Gruppe B auftauchten. Hierdurch sollten Gene der zentralen Stoffwechselwege wie z.B. des Citratzyklusses ausgeschlossen werden. In Abbildung 26 ist das Verlaufsschema der differentiellen Genomanalyse gezeigt.

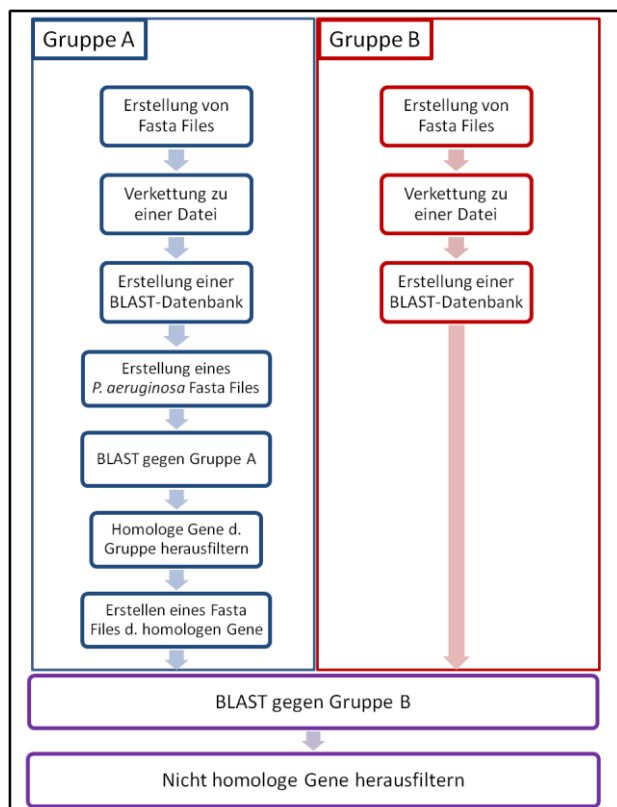


Abbildung 26: Verlaufsschema des differentiellen Genomvergleichs.

Blau: Schritte mit Genomen von Gruppe A; Rot: Schritte mit Genomen von Gruppe B; Lila: differentieller Genomvergleich von Gruppe A mit Gruppe B

Als Resultat wurde exakt ein Gen gefunden, welches sich als *hemJ* (PA0661) herausstellte. Aus diesem Grund wurde der Abgleich gegen Gruppe B verfeinert. Hierzu bestand Gruppe B zunächst nur aus dem Genom von *E. coli*, woraus 12 Gene resultierten. Zur weiteren Verfeinerung der Ergebnisse wurde auch das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* der Gruppe B hinzugefügt. Dies ergab 10 Gene. Eine Ergänzung des *B. subtilis* Genoms führte zu zwei Genen. Bei diesen Genen handelte es sich zum einen um *hemJ* und zum anderen um *aprE*. Da diese Gene für die unbekannte PPO auszuschließen waren, wurde in der vorangegangenen Gruppe nach dem wahrscheinlichsten Kandidat gesucht. Das Gen für das hypothetische Protein PA5028 wurde als wahrscheinlichster Kandidat aus dieser Gruppe gewählt, da es als einziges, mit Ausnahme von PA0661 (*hemJ*), keine bekannte Funktionalität aufwies. Dieses Gen wurde ausgehend von der genomischen DNA von *P.aeruginosa* PAO1 amplifiziert und in den pGEX-6P-1 Vektor über die *EcoRI* und *XhoI* Schnittstellen kloniert. Das resultierende Plasmid pGEX-6P-1PA5028 wurde in *E. coli* LG285 transformiert. Zur Feststellung der Komplementation wurden erneut die Porphyrine extrahiert und chromatographisch aufgetrennt. Jedoch wies dieses Chromatogramm eine starke

Akkumulation von Protogen/Proto und kaum Häm auf (Abbildung 27). Dies entspricht einer in der Häm-Biosynthese defekten Mutante.

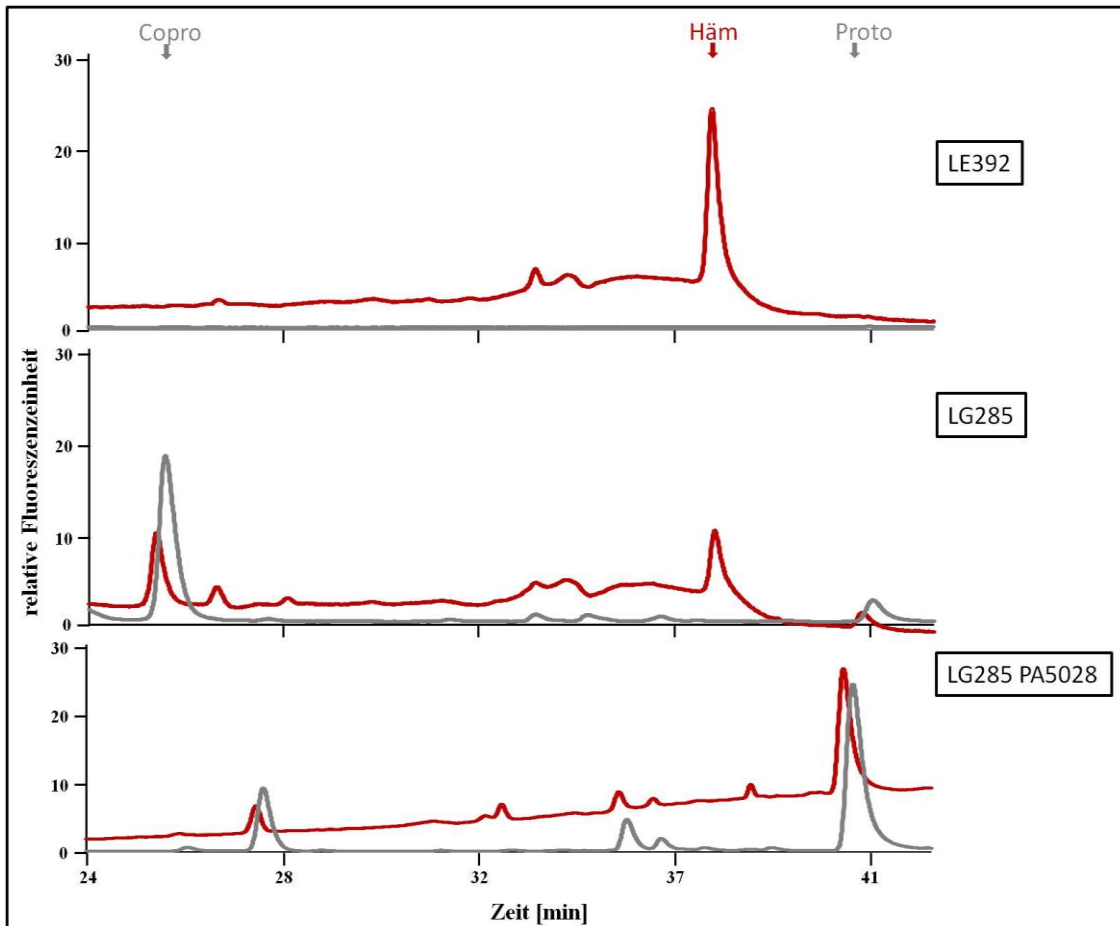


Abbildung 27: HPLC-Analyse der Porphyrinzusammensetzung von *E. coli* LG285 PA5028.

HPLC Analysen und Porphyrinaufbereitung wurden durchgeführt wie in Kapitel 2.7.13 beschrieben. Aufgetragen ist die Signalstärke gegen die Zeit in Minuten. Retentionszeit für Häm war 37.3 min., für Proto 40.7 min. und 25.6 min für Copro. Rot:UV/Vis-Chromatogramm; Grau: Fluoreszenzschromatogramm bei 630 nm nach Anregung mit 409 nm.

Die Tatsache, dass bei der vergleichenden Genomanalyse nicht die unbekannte PPO identifiziert werden konnte, könnte an der Zusammenstellung von Gruppe A liegen. Das Hauptkriterium für die Zugehörigkeit in diese Gruppe war das Vorhandensein von *hemJ* im Genom, da dieses als für eine partielle PPO kodierend angesehen wurde. Zudem wurde darauf geachtet, dass alle Klassen der Proteobakterien vertreten sind, da *hemJ* in diesen weit verbreitet ist. Jedoch waren unter den Vertretern der Gruppe A auch Organismen wie *Ehrlichia canis* Jake und *Rickettsia rickettsii* Iowa, welche beide als intrazelluläre Pathogene gelten. Die Gattung *Rickettsia* ist als Parasit mit reduziertem Stoffwechsel bekannt. Es ist also unklar, ob diese Arten bzw. die dazugehörigen Gattungen überhaupt eine vollständige Häm-Biosynthese und damit einhergehend eine

PPO prozessieren oder ob sie Häm von ihren Wirtsorganismen aufnehmen. Zudem kann es sein, dass sich innerhalb der Proteobakterien alternative Wege der Häm-Biosynthese gebildet haben, wodurch es eine zu große Diversität hinsichtlich der Häm-Synthese Gene innerhalb von Gruppe A geben könnte. Dies würde auch erklären, warum die Komplementationsversuche nicht zu den gewünschten Ergebnissen führten. Sollte es einen alternativen Weg geben, welcher nicht über eine PPO führt, sondern wie beispielsweise in dem delta-Proteobakterium *Desulfovibrio* spp. über Preccorin-2, einem Vorläufermolekül der Häm *dl*-Biosynthese (Lobo *et al.*, 2014), können diese Enzyme nicht durch Komplementation eines *E. coli* PPO defizienten Stammes nachgewiesen werden. Somit würden Komplementationsstudien in diesem Fall nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen führen.

3.3 Charakterisierung von *Leishmania major* LMJF_06_1280 als Gen für eine Protoporphyrinogen IX Oxidase des HemG-Types

Häm ist ein wichtiges Stoffwechselprodukt in *Leishmania*, welches in verschiedenen Hämoproteinen als Kofaktor vorkommt, wie zum Beispiel Cytochrom *b*₅, Cytochrom P450, Cytochrom *c*, Flavohämoglobin, sowie Häm Protein Kinasen und somit an zentralen Stoffwechselwegen beteiligt ist (Koreny *et al.*, 2013).

Interessanterweise weist *Leishmania* keine vollständige Häm-Biosynthese auf. In früheren Arbeiten wurde lediglich die Ferrochelatase, das letzte Enzym der Häm-Biosynthese, funktionell nachgewiesen (Akilov *et al.*, 2007; Chang und Chang, 1985; Sah *et al.*, 2002). Zudem konnte vor kurzem die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (CPO) aus *Leishmania major*, *Leishmania naiffi* und *Leishmania donovani* kristallisiert werden (PDB # 1VJU, PDB # 2QT8, PDB # 3E8J, PDB # 3EJO, PDB # 3DWR und PDB # 3DWS (Lee *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2004)). Auf die zugehörige Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO), der katalytisch nachfolgende Schritt des Syntheseweges, sind derzeit nur Hinweise durch Genannotationen zu finden (Koreny *et al.*, 2010). Die Bestätigung deren Funktionalität soll im Folgenden nachgewiesen werden, da dies auf eine verkürzte Häm-Biosynthese in Leishmanien hinweisen und die Protoporphyrinogen IX Oxidase zu einem Angriffspunkt für Arzneimittel machen würde.

Schon frühere Studien zeigten eine hohe Aminosäuresequenzhomologie von HemG und der putativen Protoporphyrinogen IX Oxidase von *Leishmania*, LMJF_06_1280. Es befindet sich mit LMJF_06_1270 (annotiert als sauerstoffabhängige CPO), LMJF_06_1290 (annotiert als Cytb₅) und LMJF_06_1260 (annotiert als potentieller Transporter) in einem offenen Leseraster (Abbildung 28).

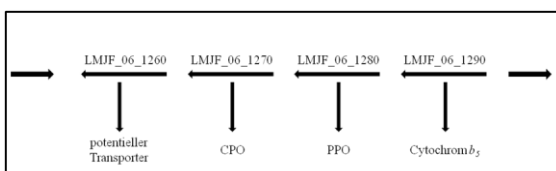


Abbildung 28: Genorganisation des LMJF_06_1280 enthaltenden offenen Leserasters.

Schwarze Pfeile geben die Genorientierung an im *L. major* Genom an. Annotierte Gennamen sind LMJF_06_1260 für einen potentiellen Transporter, LMJF_06_1270 für CPO, LMJF_06_1280 für PPO und LMJF_06_1290 für Cytb₅.

Da keine durchgängigen offenen Leseraster eukaryotischen Ursprungs bekannt sind, ist anzunehmen, dass dieses bakteriellen Ursprungs ist. Ein Abgleich der Sequenz von

LMJF_06_1280 mittels BLAST zeigte unter den Eukaryoten eine 71%-ige Aminosäuresequenzidentität mit der PPO (AEM25297.1) von *Leptomonas costaricensis*, sowie eine 67%-ige Aminosäuresequenzidentität mit der PPO (AEM25292.1) von *Crithidia acanthocephali* (Abbildung 29). Beim Aminosäuresequenzvergleich von LMJF_06_1270, der putativen CPO aus *Leishmania*, zeigte sich eine Identität von 84 % zur CPO (AEM25317.1) aus *Leptomonas costaricensis* und 73 % zur CPO (AEM25322.1) *Strigomonas oncopelti* (zuvor *Crithidia oncopelti*). Bei beiden Arten handelt es sich um nahe Verwandte, die möglicherweise einen gemeinsamen Vorfahren haben. Interessanterweise weisen sowohl *Leptomonas* als auch *Crithidia* eine unvollständige Häm-Biosynthese beginnend mit der CPO auf. Unter den Bakterien besaß LMJF_06_1280 die höchste Aminosäuresequenzidentität mit der PPO (WP_013359725.1) von *Pantoea vagans* (58 %) und der PPO (WP_012004735.1) von *Serratia proteamaculans* (56 %) (Abbildung 29), welche beide zu den Enterobacteriaceae gehören. Zudem wies LMJF_06_1270 eine 71%-ige Aminosäuresequenzidentität mit der CPO (WP_016782840.1) von *Pseudomonas fragi* auf, welches ebenfalls zu den Enterobacteriaceae zählt

Dies, zusammen mit dem ungewöhnlichen offenen Leseraster, lässt den Schluss zu, dass LMJF_06_1280 und LMJF_06_1270 von einem Vorfahren der Trypanosomatida durch Endosymbiose von einem Proteobakterium aufgenommen wurden. Aus diesem könnten evolutionär später die Gattungen *Leishmania*, *Crithidia*, *Leptomonas* sowie *Endotrypanum* hervorgegangen sein. Bei dem Endosymbiont könnte es sich um das gleiche Proteobakterium gehandelt haben, aus welchem laut Endosymbiontentheorie auch die Mitochondrien hervorgegangen sind. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit, basierend auf den Aminosäuresequenzen, zu *E. coli* HemG, konnte dieser Organismus hervorragend als Modell zur Analyse der *in vivo* Aktivität des LMJF_06_1280 Genproduktes genutzt werden.

3.3.1 Komplementationstudien von *E. coli* LG285 mit *Leishmania major* LMJF_06_1280

Zum Test der PPO Aktivität von *L. major* LMJF_06_1280 wurde die zugehörige cDNA auf einem Plasmid in den PPO-defizienten Stamm *E. coli* LG285 transformiert und auf Komplementationsfähigkeit hin untersucht. In Wachstumsexperimenten zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Wachstums von *E. coli* LG285 pGEXhemGL im Vergleich mit der mit einem pGEX-6P-1 Leervektor transformierten Mutante, welche nahezu dem des Wildtyps entsprach (Abbildung 30).

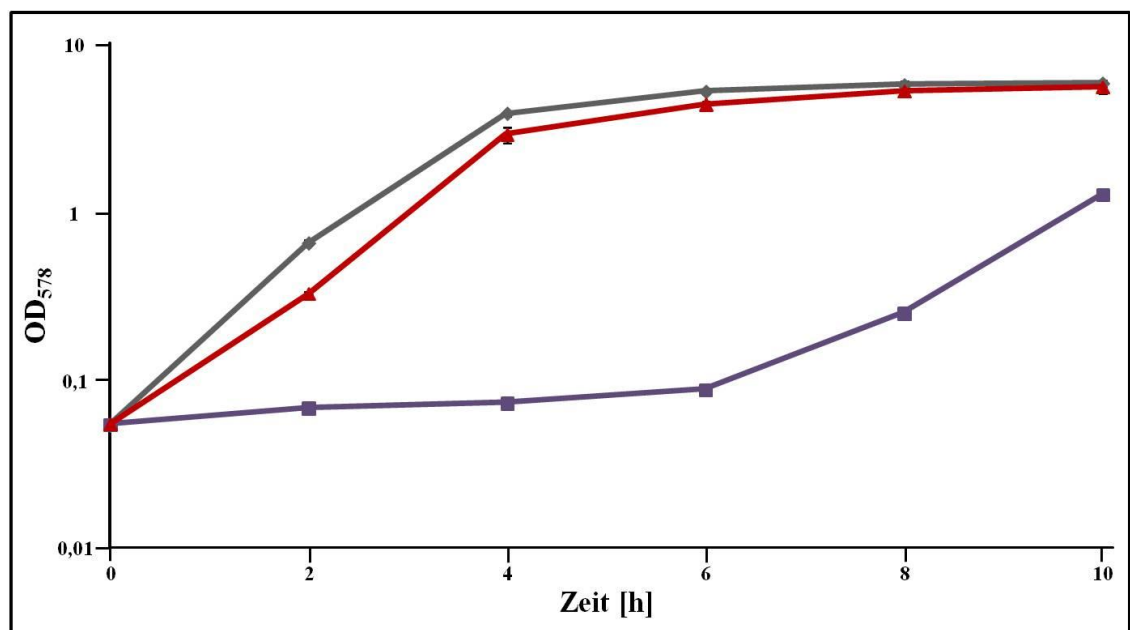


Abbildung 30: Wachstum der Δ hemG Mutante *E. coli* LG285 nach Komplementation mit LMJF_06_1280 cDNA.

Die Veränderung der optischen Dichte bei 578 nm wurde über die Zeit aufgetragen. Wachstumskurven wurden wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben durchgeführt. ■: *E. coli* LG285 pGEX-6P-1; ▲: *E. coli* LG285 pGEXhemGL; ◆: *E. coli* LE392.

Interessanterweise wurde der Komplementationseffekt noch deutlicher, wenn auch im Wildtyp ein Leervektor induziert wurde. Hierbei zeigte die komplementierte Mutante sogar eine höhere Wachstumsrate als der Wildtyp. Wobei auch in diesem Experiment der Wildtyp ein deutlich höheres Wachstum aufwies als *E. coli* LG285 pGEX-6P-1 (Abbildung 31).

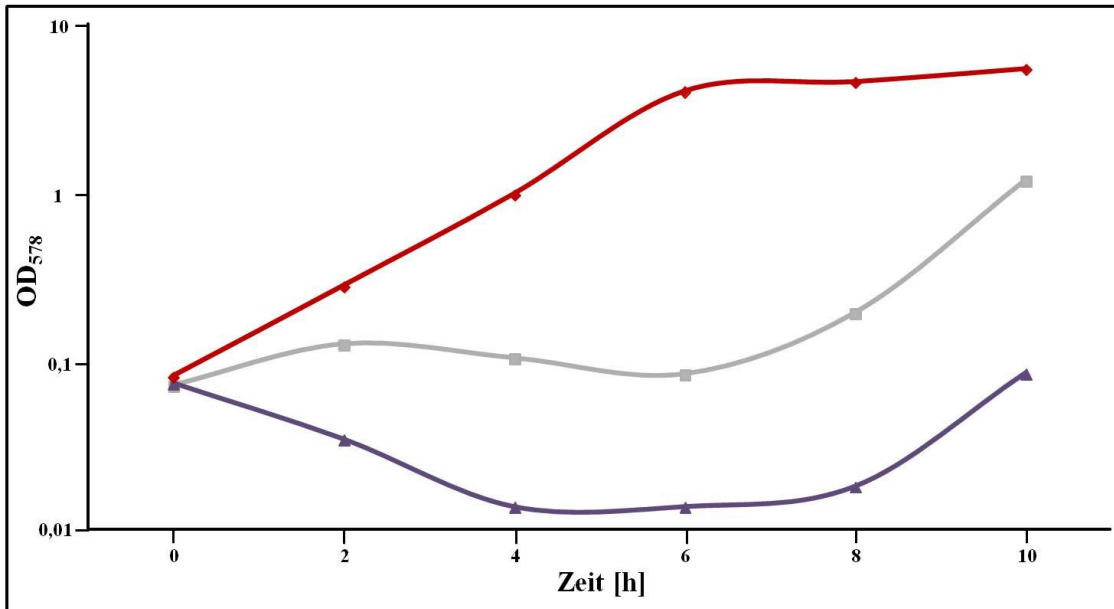


Abbildung 31: Einfluss des Vektors pGEX auf das Wachstum der $\Delta hemG$ Mutante *E. coli* LG285 nach Komplementation mit LMJF_06_1280 cDNA.

Die Veränderung der optischen Dichte bei 578 nm wurde über die Zeit aufgetragen. Wachstumskurven wurden wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben durchgeführt.

▲ : *E. coli* LG285 pGEX-6P-1; ◆ : *E. coli* LG285 pGEXhemGL; ■ : *E. coli* LE392 pGEX-6P-1

Jedoch schien es so, dass das Leerplasmid einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Wildtyps hatte, da die Mutante und die komplementierte Mutante das gleiche Wachstumsverhalten wie in den vorangegangenen Experimenten zeigten. Die Abnahme des Wachstums von *E. coli* LE392 pGEX-6P-1 lässt sich durch die über Induktion des Plasmids hervorgerufene Produktion des Glutathion-S-transferase Tags erklären. Die Produktion dieses Proteins befindet sich unter Kontrolle eines starken Promotors, wodurch es zu einer ausgeprägten Überproduktion von GST kommt. Die für die Überproduktion benötigte Energie und Ressourcen können nicht mehr zur Proliferation genutzt werden, wodurch es zu einer Abnahme in der Wachstumsrate kam. Dieser Einfluss sollte auch in der *L. major* HemG exprimierenden Mutante zu beobachten sein. Da sich deren Wachstum jedoch nur unwesentlich vom Wachstum des *E. coli* Wildtyps unterscheidet ist der Komplementationseffekt als noch prägnanter anzusehen.

Um zu beweisen, dass die gefundenen Veränderungen im Wachstumsverhalten auf eine wiederhergestellte Häm-Biosynthese und somit auf eine funktionsfähige PPO zurückzuführen sind, wurden Häm sowie dessen Vorläufermoleküle extrahiert und chromatographisch aufgetrennt (Abbildung 32).

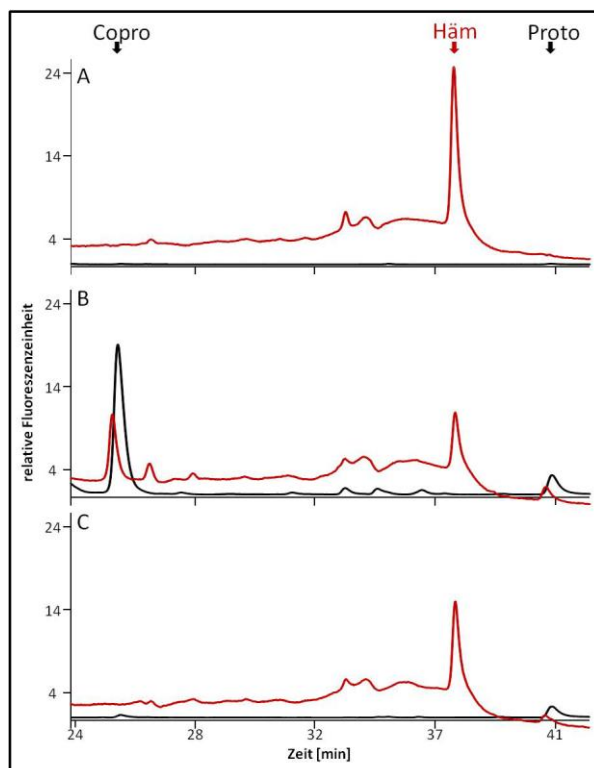


Abbildung 32: Vervollständigte Häm-Biosynthese von *E. coli* LG285 nach Komplementation mit *L. major* LMJF_06_1280 cDNA.

HPLC Analysen und Porphyrinaufbereitung wurden durchgeführt wie in Kapitel 2.7.13 beschrieben. Aufgetragen ist die Signalstärke gegen die Zeit in Minuten. Retentionszeit für Häm war 37.3 min., für Proto 40.7 min. und 25.6 min für Copro. Rot: UV/Vis-Chromatogramm; Grau: Fluoreszenzschromatogramm bei 630 nm nach Anregung mit 409 nm.; A: Wildtyp *E. coli* LE392; B: *AhemG* Mutante *E. coli* LG285; C: *AhemG* Mutante *E. coli* LG285 komplementiert mit pGEXhemGL

Wie erwartet wurden im *E. coli* LE392 Wildtyp nur Häm und keine Vorläufermoleküle nachgewiesen (Abbildung 32A), da die Häm-Biosynthese unter physiologischen Bedingungen streng reguliert wird. Im Gegensatz dazu, zeigte sich in der *E. coli hemG* Mutante eine Akkumulation von Proto/Protogen und vorrangig von Coprogen/Copro (Abbildung 32B). In früheren Studien konnte schon gezeigt werden, dass es bei PPO Mutanten zu einer vermehrten Akkumulation von Coprogen/Copro kommt (Sasarman *et al.*, 1979). Hierbei wurde beobachtet, dass die Proto/Protogen Konzentration mit der Zeit drastisch abnimmt und nach 72 Stunden in PPO Mutanten gar kein Proto/Protogen nachgewiesen werden konnte. Es wird vermutet, dass es zu einer Autooxidation von

Protogen kommt, wodurch Proto entsteht (Sasarman *et al.*, 1979). In das so umgesetzte Proto kann nun, katalysiert durch die Ferrochelatase, Eisen insertiert werden, wodurch Häm entsteht. Diese Theorie erklärt auch das Häm signal in der *hemG* Mutante. Da die Autooxidation nicht enzymatisch katalysiert wird, geht diese Reaktion jedoch recht langsam vonstatten, wodurch das Vorhandensein von Protogen/Proto nach kurzer Zeit, jedoch nicht mehr nach langen Inkubationen zu erklären ist (Sasarman *et al.*, 1979). Im Gegensatz dazu häuft sich Coprogen in der Zelle über die Zeit an, da es nicht adäquat weiter umgesetzt werden kann. Bei einem Überschuss von Coprogen innerhalb der Zelle kann dieses zu Copro autooxidieren, welches nicht weiter umgewandelt werden kann und sich somit als toxisches Abfallprodukt in der Zelle ansammelt. Auch dies konnte schon in früheren Studien gezeigt werden (Sasarman *et al.*, 1979). Beide Theorien können mit dem Wachstumsverhalten der Mutante in Übereinstimmung gebracht werden. So konnte diese aufgrund des geringen Hämgehalts innerhalb der Zelle durch die oben beschriebene Umsetzung von Protogen zu Häm noch wachsen, jedoch reichte die Hämkonzentration nicht aus um eine normale Proliferation zu ermöglichen. Dafür, dass das detektierte Häm tatsächlich auch in Hämoproteine als funktionsfähige prosthetische Gruppe eingebaut wurde, spricht die nachgewiesene Funktionalität der Katalase von *E. coli* LG285. Zudem wurden durch die Akkumulation von Copro vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet. Diese wiederum führten durch Protein- und Lipidoxidation vermutlich zu Schäden innerhalb der Zelle, wodurch es nach 24 - 48 Stunden zur kompletten Zelllyse kommen konnte wodurch die Porphyrine austraten, was zur Rotfärbung des Mediums führte.

In der komplementierten Mutante, in der der Biosyntheseweg durch die cDNA des *L. major* Gens LMJF_06_1280 wiederhergestellt war, war die Konzentration sowohl von Coprogen/Copro als auch von Protogen/Proto drastisch vermindert, wobei der Hämgehalt der Probe im Vergleich zur nicht komplementierten Mutante erhöht war (Abbildung 32C). Das Vorkommen von Protogen/Proto in der komplementierten Mutante lässt sich zum einen durch das genutzte System erklären. In diesem Versuch befand sich die LMJF_06_1280 cDNA auf dem pGEX-6P-1 Plasmid unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Hierbei handelt es sich um einen relativ starken Promotor, welcher direkt durch IPTG induziert werden kann (de Boer *et al.*, 1983). Starke Promotoren führen zu starken Überproduktionen des *downstream* liegenden Gens. Eine solche Überproduktion beeinflusst jedoch den gesamten Metabolismus des Organismus,

wodurch es auch zu Unregelmäßigkeiten im Häm-Metabolismus kommen kann. Eine andere Erklärung beruht auf den Unterschieden in der Primärstruktur von LMJF_06_1280 und *E. coli* HemG (52% Aminosäuresequenzhomologie). Diese Unterschiede beeinflussen in geringem Maße auch die tertiäre Struktur des Proteins. Auch wenn sich beide Moleküle in ihrer sekundären Struktur kaum voneinander unterscheiden, könnte dies die Reaktivität von LMJF_06_1280 in *E. coli* beeinflussen welches somit nicht die gleichen Translationsraten erzielen kann wie *E. coli* HemG.

In Übereinstimmung mit dem verbesserten Wachstum der komplementierten Mutante zeigt die Analyse ihrer Porphyrin Zusammensetzung jedoch eine eindeutige Wiederherstellung des Biosyntheseweges. Hieraus folgt schlussendlich, dass *L. major* LMJF_06_1280 eine PPO kodiert. Aus diesem Grund wird von nun an *L. major* LMJF_06_1280 als *L. major hemG* bezeichnet.

3.3.2 Elektronentransfer von Protoporphyrinogen durch *L. major* HemG zur *E. coli* Fumaratreduktase

Zusätzlich zu den *in vivo* Studien wurden auch *in vitro* Analysen durchgeführt. In früheren Arbeiten zu *E. coli* HemG konnte eine Interaktion zwischen der PPO und der *E. coli* Atmungskette gezeigt werden. Hierbei werden die bei der Reaktion von Protogen zu Proto freiwerdenden Elektronen zum Chinon-Pool transferiert. Dadurch kommt es zu einer Umwandlung vom Chinon über Hydrochinon zu Chinol (Möbius *et al.*, 2010). Das Chinol wird wiederum durch Abgabe der Elektronen an terminale Oxidasen wie der Cytochrom *bd* Oxidase, Cytochrom *b_o* Oxidase, Nitratreduktase und Fumaratreduktase recycelt. Hierbei dient unter aeroben Bedingungen Sauerstoff als Elektronenakzeptor der beiden Chinol Oxidasen und unter anaeroben Bedingungen Fumarat und Nitrat den entsprechenden Reduktasen (Möbius *et al.*, 2010). Alle Enzyme mit Ausnahme der Fumaratreduktase koppeln den Elektronentransport mit einem Protonentransfer durch die Cytoplasmamembran. Die so generierte protonenmotorische Kraft dient der ATPase zur ATP Produktion (Möbius *et al.*, 2010). Ausgehend von dieser Theorie wurden *L. major* HemG produzierende *E. coli* Zellen unter anaeroben Bedingungen mit Fumarat angezogen und deren zellfreier Extrakt gewonnen. Dem zellfreien Extrakt wurden zudem noch Protogen, welches durch Reduktion von Proto hergestellt wurde, ein Kinetikpuffer sowie ein Elektronenakzeptor zugesetzt. Durch Zugabe von Fumarat konnte auf die Fumaratreduktase im zellfreien Extrakt als Elektronenakzeptor direkt

getestet werden. Die Zugabe von Nitrat zum Reaktionsansatz diente in diesen Versuchen als interne Negativkontrolle. Durch Abwesenheit von Nitrat im Anzuchtmedium war die Nitratreduktase von *E. coli* nicht produziert worden. Somit ist eine Übertragung der Elektronen von *L. major* HemG via des Chinon-Pools zur Nitratreduktase nicht möglich, sodass es hier zu keiner bzw. kaum einer Umsetzung des Substrats aufgrund des inaktiven Elektronenakzeptorsystems kommen sollte. Zudem wurde hierdurch getestet, ob Endelektronenakzeptoren wie Nitrat in der Lage sind, direkt Elektronen von *L. major* HemG aufzunehmen und somit den Übertragungsweg über den Chinon-Pool und die Terminale Oxidase zu umgehen. Ubichinon-1 wurde als direkter Elektronenakzeptor getestet.

Der genutzte Aktivitätstest beruht auf der Umsetzung des farblosen, nicht fluoreszierenden Protogens in das rötliche, fluoreszierende Proto. Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach Anregung des Fluorophors bei 409 nm bei 633 nm mittels eines Lumineszenzspektrometers über 60 Minuten aufgenommen (Abbildung 33).

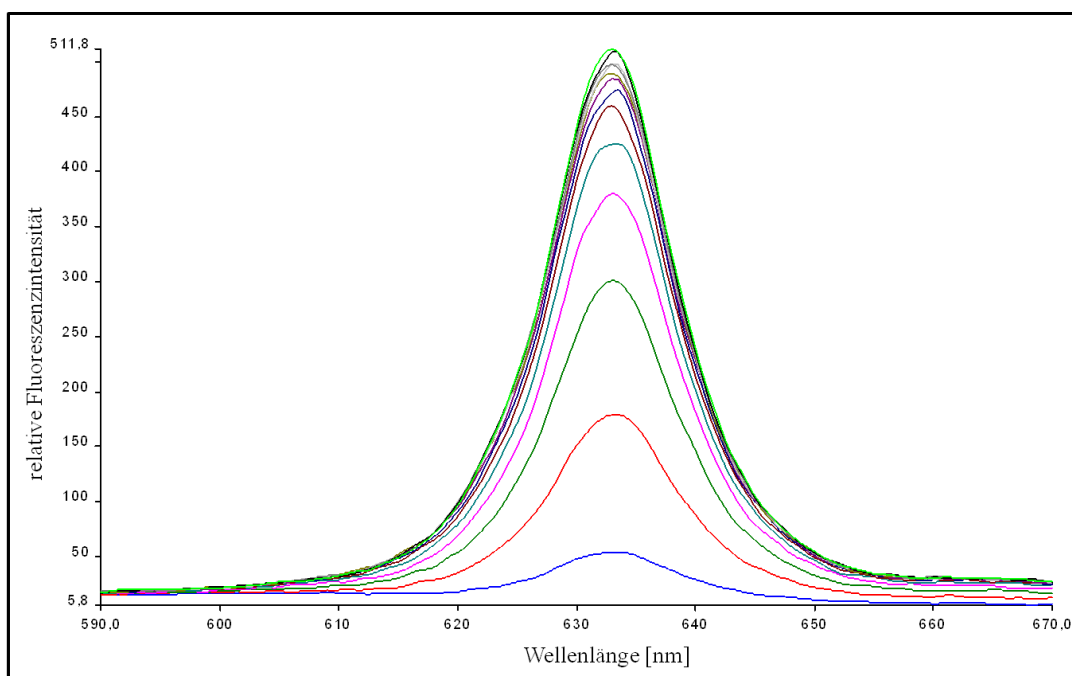


Abbildung 33: Fluoreszenzspektren der Protoporphyrinogen IX Oxidase-Aktivität von *E. coli* OverExpress(tm)C43(DE3), in welchen *Leishmania major* HemG überproduziert wurde.

Der Aktivitätsassay wurde wie in Kapitel 2.7.11 beschrieben durchgeführt. Als Elektronenakzeptor diente 10 mM Fumarat. Fluoreszenzspektren wurden alle 5 Minuten aufgenommen.

Schon bei 0 Minuten war eine Umsetzung des Substrats zu Proto sichtbar, welches entweder an einer unvollständigen Umsetzung von Proto durch das Reduktionsmittel bei der Herstellung des Substrats oder an einer beginnenden Umsetzung des Substrats

zwischen dem Mischen der Reagenzien und der Einstellung in die Messapparatur liegen könnte. Negativkontrollen mit zellfreiem Extrakt ohne *L. major* HemG wurden getestet, um die Aktivität der in diesen Zelllysaten befindlichen *E. coli* PPO zu dokumentieren und somit das Hintergrundsignal zu ermitteln. Die Emissionsintensität wird im folgendem in Säulendiagrammen dargestellt, wobei diese die Intensität nach 60 Minuten widerspiegeln.

In Abbildung 34 sind die Emissionsintensitäten unter Einfluss der drei verschiedenen Elektronenakzeptoren dargestellt.

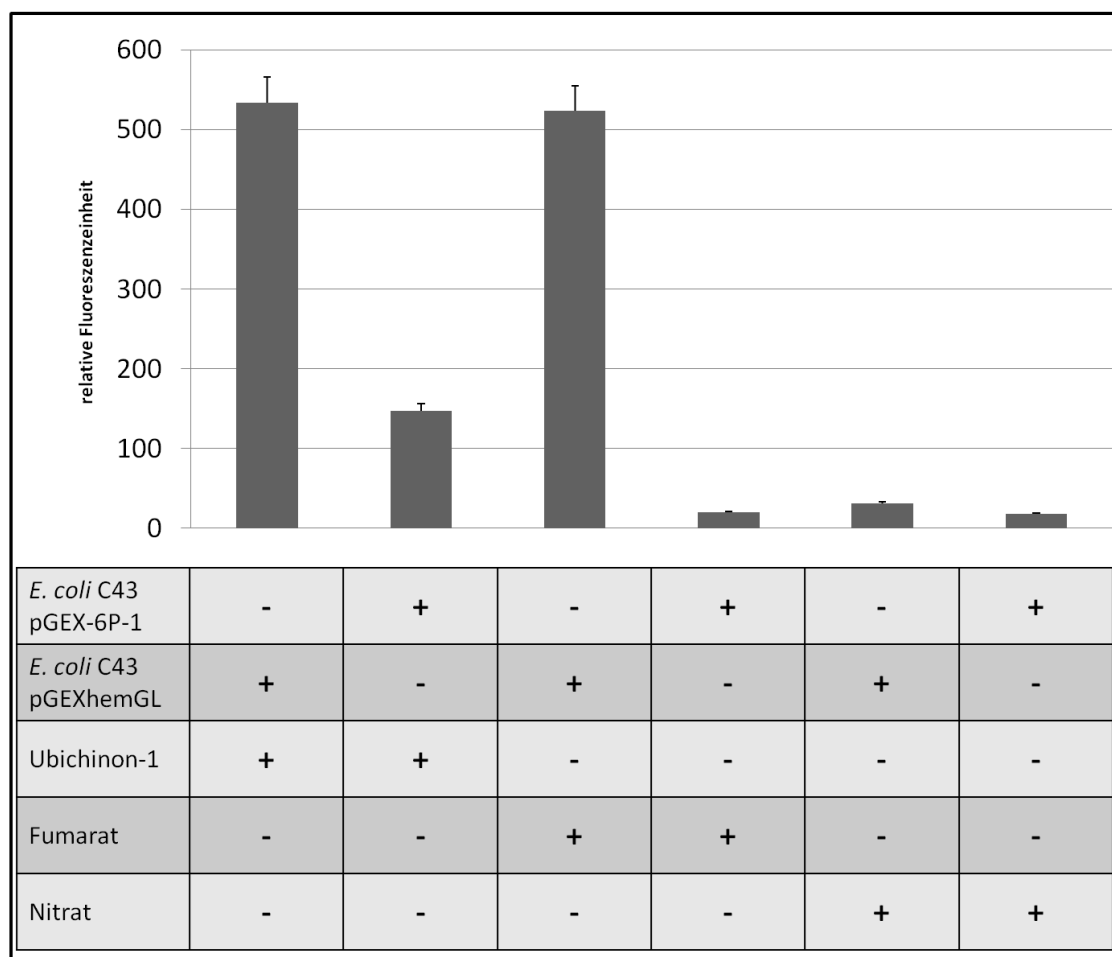


Abbildung 34: Protoporphyrinogen IX Oxidase-Aktivität von *E. coli* OverExpress(tm)C43(DE3) in welchen *Leishmania major* HemG überproduziert wurde.

Der Aktivitätstest wurde wie in Kapitel 2.7.11 beschrieben durchgeführt. Es wurden je 90 μ M Ubichinon-1, 10 mM Fumarat oder 10 mM Nitrat dem Assay beigelegt. Abgebildet ist die Fluoreszenz bei $t = 60$ min. Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung für $n = 3$ an.

Bei Ubichinon-1 als direktem Elektronenakzeptor war die Intensität der Emission signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Die in der dazugehörigen Kontrolle detektierbare Emission ist auf eine Aktivität des *E. coli* HemG des Wirtstammes zurückzuführen. Da die Umsetzung von Protogen zu Proto durch *E. coli* HemG jedoch

deutlich geringer war im Vergleich zu *L. major* HemG, kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss des *E. coli* HemG an der Gesamt-PPO-Aktivität vernachlässigbar ist. Somit wurde gezeigt, dass Ubichinon-1 als direkter Elektronenakzeptor fungiert. Anhand der Tests mit Fumarat war ersichtlich, dass dieses als Elektronenakzeptor dienen kann. Wobei in diesem Fall aller Wahrscheinlichkeit nach jedoch nicht Fumarat direkt als Elektronenakzeptor diene sondern, wie bereits beschrieben, die Fumaratreduktase (Möbius *et al.*, 2010). Diese nutzt die Elektronen um Fumarat in Succinat umzuwandeln. Einen Hinweis darauf, dass in diesem Fall die Fumaratreduktase und nicht Fumarat selbst als Elektronenakzeptor diene, lieferte der Assay mit Nitrat. Unter den genutzten Versuchsbedingungen war die Nitratreduktase, welche nachweislich als direkter Elektronenakzeptor von *E. coli* HemG fungiert, supprimiert. Dass in diesem Fall *L. major* HemG inaktiv war, spricht dafür, dass Nitrat nicht als direkter Elektronenakzeptor dienen konnte. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass auch Fumarat vermutlich nur als indirekter Elektronenakzeptor über die Fumaratreduktase fungiert, da es sich hierbei um ähnliche terminale Oxidasen-Systeme handelt.

Aus den gewonnen Daten war ersichtlich, dass *L. major* HemG auch *in vitro* aktiv war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es analog zu *E. coli* HemG offenbar mit Enzymen der Atmungskette interagiert.

In allen weiteren Studien wurde im Falle von zellfreien Lysaten Fumarat als Elektronenakzeptor genutzt, um das Hintergrundsignal durch *E. coli* HemG des Wirtsstammes möglichst gering zu halten.

3.3.3 Gereinigtes *L. major* HemG hat PPO Aktivität *in vitro*

Bei der Verwendung von zellfreien Lysaten kam es zum Einfluss von *E. coli* HemG auf die Messergebnisse, weshalb *L. major* HemG rekombinant produziert und gereinigt wurde um einen ultimativen Beweis für seine PPO Aktivität zu erlangen. Hierbei wurde zunächst das bereits für die vorangegangenen Experimente verwendete Plasmidsystem genutzt und verschiedene Produktionsbedingungen getestet, wie Temperatur (37 °C, 25 °C, 17 °C), Produktionsdauer (3 h, 5h, über Nacht), eingesetzte Konzentration von IPTG (1 mM, 500 µM, 100 µM, 10 µM) sowie verschiedene Produktionsstämme (*E. coli* BL21(DE3), *E. coli* C43(DE3), *E. coli* C41(DE3), *E. coli* BL21pLys(DE3)). Die Überproduktion von *L. major* HemG in pGEX-6P-1 konnte jedoch nicht in zur

Aufreinigung ausreichenden Mengen erzielt werden. Aus diesem Grund wurde ein anderes Konstrukt, pET32aHemGL, gewählt, bei welchem *L. major* HemG ebenfalls unter der Kontrolle vom *tac* Promotor steht, jedoch anstelle des N-terminalen GST-Tag ein N-terminaler Tag bestehend aus S-Tag, His_{6x}-Tag sowie Trx-Tag fusioniert ist. Auch mit diesem Konstrukt wurden die oben genannten verschiedenen Produktionsbedingungen getestet. Es war in diesem Fall möglich, das Fusionsprotein rekombinant in ausreichender Konzentration herzustellen, jedoch ausschließlich in Proteinaggregaten. Die Proteinaggregate wurden zur Extraktion des Fusionsproteins wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben aufgereinigt und denaturiert. Anschließend wurde das Fusionsprotein durch sukzessiven Entzug des zur Denaturierung eingesetzten Guanidiniumhydrochlorids mittels Dialyse renaturiert. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden per SDS-PAGE nachvollzogen (Abbildung 35).

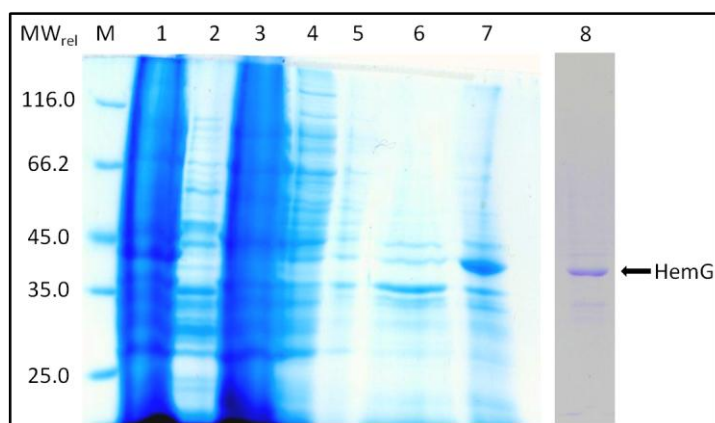


Abbildung 35: SDS-Polyacrylamidgel (12%) der Reinigung von *Leishmania major* HemG.

Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE getrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung visualisiert. M: Proteingrößenmarker. Die relativen Molekülgrößen (kDa) sind links aufgeführt. 1: Zellsediment nach Produktion; 2: Überstand nach Zellaufschluss; 3: Zellsediment nach Zellaufschluss; 4: Zellsediment nach 1. Isolationspuffer-Behandlung; 5: Zellsediment nach 2. Isolationspuffer-Behandlung; 6: Zellsediment in 100 mM Tris-HCl; 7: Fraktion zur Dialyse; 8: Überstand nach Dialyse; dominante Bande zwischen 45 und 35 kDa zeigt HemG an.

Das Fusionsprotein konnte bei einer molekularen Masse M_r von 42.000 \pm 5000 im SDS-Gel detektiert werden, welches mit dem errechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins gut übereinstimmt. Es wurden ca. 3 mg/L scheinbar homogenen Proteins bei der Produktion gewonnen.

Mit dem gewonnenen homogenen anaerobisierten *L. major* HemG wurden im Weiteren analog zu den vorherigen Studien mit zellfreiem Extrakt PPO-Assays durchgeführt (Abbildung 36).

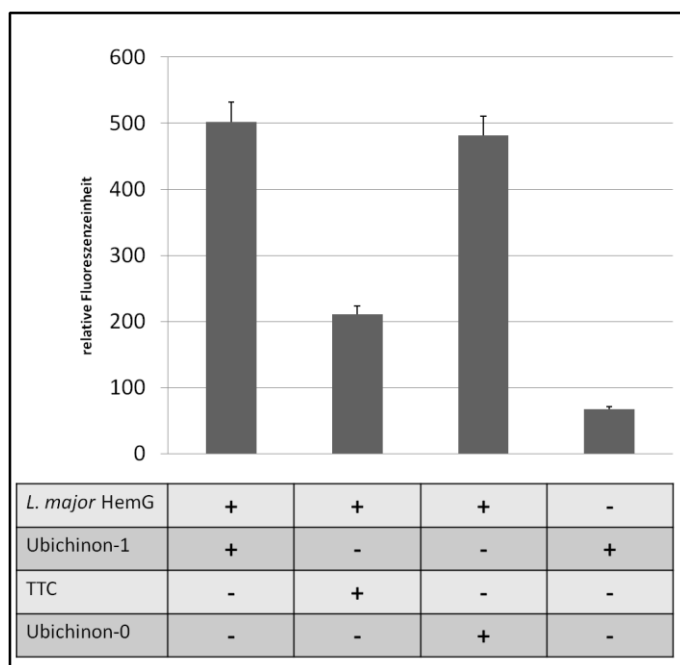


Abbildung 36: Protoporphyrinogen IX Oxidase-Aktivität des gereinigten *Leishmania major* HemG. Der Aktivitätstest wurde wie in Kapitel 2.7.11 beschrieben durchgeführt. Es wurden je 90 μM Ubichinon-1 bzw. Ubichinon-0 und 2,5 μM TTC dem Assay beifügt. Abgebildet ist die Fluoreszenz bei $t = 60$ min. TTC: Triphenyltetrazoliumchlorid. T-bars geben die Standardabweichung für $n = 3$ an.

Durch die Verwendung von nahezu homogenem gereinigtem Protein konnten ausgehend von der Emission durch eine zuvor erstellte Kalibrierkurve (Kapitel 2.7.11) die Konzentrationen an gebildetem Proto und somit die Umsetzungsraten in Abhängigkeit von verschiedenen Elektronenakzeptoren ermittelt werden. Die Umsetzungsraten variierten je nach Elektronenakzeptor zwischen 593 nM Proto pro mg^{-1} Protein h^{-1} für Ubichinon-1, 572 nM Proto pro mg^{-1} Protein h^{-1} für Ubichinon-0 und 211 nM Proto pro mg^{-1} Protein h^{-1} für Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Diese Umsetzungsraten sind bis zu 10-mal so hoch wie vergleichbare Analysen für *E. coli* HemG (21-23 nM Proto pro mg^{-1} Protein h^{-1} mit TTC (Möbius *et al.*, 2010)) zeigten. Dies deutet auf eine starke PPO Aktivität von *L. major* HemG hin. Da *Leishmania* im amastigoten Stadium innerhalb der Makrophagen in aciden Phagolysosomen leben, in denen die Zufuhr von Häm-Vorläufermolekülen stark limitiert ist, erscheint eine potente PPO sinnvoll, da dadurch höhere Ausbeuten erzielt werden können. Zum anderen war auffällig, dass beide Ubichinone deutlich höhere Aktivitäten aufwiesen als TTC. Hierbei gilt zu beachten, dass auch Ubichinon-1 eine höhere Aktivität zeigte als Ubichinon-0. Dies könnte mit dem natürlichen Substrat von *L. major* HemG zusammenhängen. Falls *L. major* HemG auch innerhalb von Leishmanien aktiv ist, werden die Elektronen höchstwahrscheinlich an das natürlicherweise in *Leishmania* vorkommende Ubichinon-9 weitergeleitet. Da

sich Ubichinon-0 und Ubichinon-1 nur anhand der Anzahl ihrer Isopreneinheiten der an Position 5 befindlichen Isoprenoidseitenkette unterscheiden, kann von einem Einfluss der Isoprenoidseitenkette auf die Aktivität der PPO geschlossen werden. Bei TTC hingegen handelt es sich um ein Tetrazol, welches an Position 2, 3 und 5 einen Phenolrest aufweist. Dadurch nimmt es mehr Raum ein, wodurch scheinbar die Reaktivität gemindert wurde und somit die Aktivität von *L. major* HemG.

3.3.4 FMN ist der Kofaktor von *L. major* HemG

Typischerweise nutzen PPO des Typs HemY und HemG Flavinnukleotide bei der sechs Elektronen übertragenden Oxidation von Protogen zu Proto. Bei HemY handelt es sich um das Flavinnukleotid Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), wohingegen für *E. coli* HemG Flavinmononukleotid (FMN) nachgewiesen wurde (Möbius *et al.*, 2010). Bei der Elution von *L. major* HemG von der Cobalt-chelatierten Affinitätssäule im Zuge des Versuchs der Rückfaltung des Proteins während der Bindung an eine Affinitätssäule (Kapitel 2.7.3) konnte ein UV/Vis-Signal bei 430 nm detektiert werden, welches gleichzeitig mit dem Protein, gemessen bei 280 nm, eluierte (Abbildung 37).

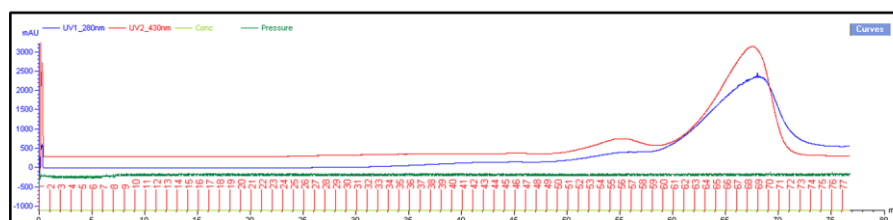


Abbildung 37: UV/Vis-Chromatogramm der Elution von *Leishmania major* HemG.

Es ist die relative Absorption gegen die Retentionszeit aufgetragen. Blau: Absorption bei 280 nm (Protein); Rot: Absorption bei 430 nm (Flavin). Elutionsfraktionsnummern in rot unterhalb der Kurven.

Die gewonnene Proteinlösung war gelblich verfärbt. Beide Beobachtungen zusammengenommen wiesen darauf hin, dass auch *L. major* HemG ein Flavinnukleotid als Kofaktor gebunden hatte (Abbildung 38).



Abbildung 38: Flavinhaltige Proteinfraktion von *Leishmania major* HemG.

Die gelbliche Farbe der Proteinfraktion deutet auf Flavin hin.

Um dieses zu identifizieren wurde das Protein durch Trichloressigsäure denaturiert und der Überstand wurde chromatographisch mittels HPLC aufgetrennt. FMN und FAD dienten als Standards, wodurch das Flavinnukleotid von *L. major* HemG anhand seiner Retentionszeit identifiziert werden konnte. Abbildung 39 zeigt die erhaltenen Chromatogramme.

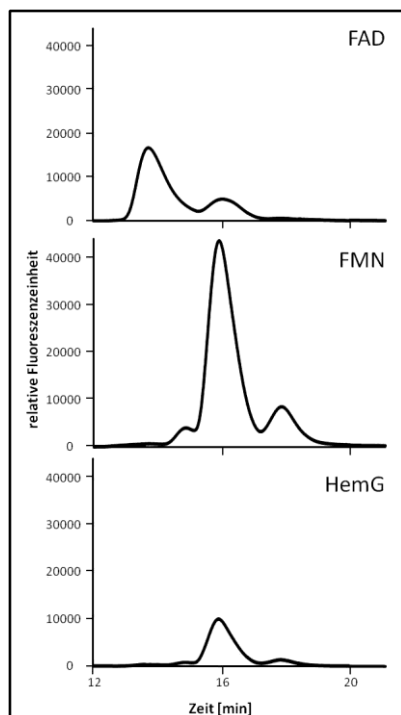


Abbildung 39: Chromatogramme des *L. major* HemG Kofaktors.

HPLC Analysen und Extraktion des Kofaktors wurden durchgeführt wie in Kapitel 2.7.14 beschrieben. Aufgetragen ist die Fluoreszenz gegen die Retentionszeit in Minuten. Absorption bei 525 nm nach Anregung bei 430 nm Anregung bei Retentionszeit für FAD war 13.28 min und Retentionszeit für FMN war 15.55 min.

Bei dem extrahierten Flavin handelte es sich eindeutig um FMN. Dass dieses nach der Präzipitation im Überstand detektierbar war, weist auf eine nicht kovalente Bindung des Kofaktors hin. Dennoch scheint es sich um eine relativ starke Bindung zu handeln, da der Kofaktor bei der Rückfaltung von *L. major* HemG in ausreichender Konzentration vorhanden war um eine Aktivität zu gewährleisten. Die Beobachtung des nicht kovalent gebundenen FMN ist analog zu *E. coli* HemG.

3.3.5 Identifikation von katalytisch oder strukturell bedeutenden Aminosäureresten von *L. major* HemG

Da Proteine des HemG Types eng mit Flavodoxinen verwandt sind, wurde in früheren Studien die tertiäre Proteinstruktur von *E. coli* HemG auf Grundlage der Kristallstruktur des Flavodoxins FldA von *Aquifex aeolicus* vorhergesagt. Basierend auf dem so gewonnenen *E. coli* HemG Strukturmodell wurde auch die Tertiärstruktur von *L. major* HemG modelliert (Abbildung 40).

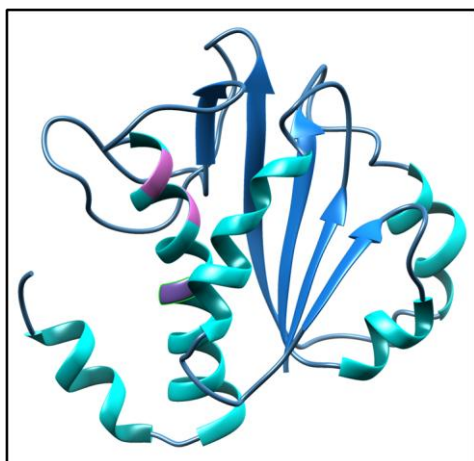


Abbildung 40: Proteinmodell von *L. major* HemG.

Rosa: Position der in dieser Studie mutierten Tyrosine; Lila: Position des in dieser Studie mutierten Arginins.

Die Struktur besteht demnach aus einem 5-strängigen β -Faltblatt und 5 α -Helices, welche sich mit Ausnahme des C-terminalen Bereichs in einer einzelnen Rossmannfalte der Struktur β - α - β - α - β zusammenlagern. Rossmannfaltungen sind Struktur motive, welche sich häufig in Nukleotid-bindenden Proteinen ausprägen. Hierbei ist zu beachten, dass pro Rossmannfalte ein Nukleotid binden kann, wie es in HemG durch die Bindung von FMN geschieht. Am C-Terminus befinden sich zwei aufeinanderfolgende β -Faltblattstränge und zwei C-terminal gelegene α -Helices, wobei die Aminosäurereste 131 - 152 einen langkettigen Insertionsloop darstellen, durch den sich typischerweise HemG ähnliche Proteine von Flavodoxinen unterscheiden. Boynton *et al.* zeigten, dass bei der *hemG*-defizienten *E. coli* SASX38 Mutante eine Deletion der Nukleotide 152 - 470 vorliegt, welche in einem inaktiven HemG Protein mit 106 fehlenden Aminosäuren resultierte. Diese fehlende Aminosäuresequenz umfasste auch die inserierte α -Helix, welche nicht bei Flavodoxinen vorkommt. Deshalb wurde angenommen, dass es sich hierbei möglicherweise um die katalytisch aktive Region des Enzyms handelt. Die α -Helix, welche für die Katalyse essentiell sein soll, umfasst in *L. major* HemG die

Aminosäurereste 131 - 152, wobei die Konsensussequenz Y[PS][RS]Yxxx[DK]Rx[LF]IM ist. Zur weiteren Analyse dieser aktiven Region wurden Proteinmutanten der Tyrosine an Position 134 und 137 sowie des Arginins an Position 142 erstellt (Abbildung 40). Es wurde vermutet, dass die Tyrosine am Elektronentransport innerhalb des Proteins beteiligt sind (Biskup *et al.*, 2013). Arginin hingegen wird häufig mit Protonenweiterleitung und Stabilisierung des Redoxpotentials in Verbindung gebracht (Storbeck *et al.*, 2011). Zusätzlich dazu sind Arginine auch häufig an der Tetrapyrrolbindung durch Koordinierung der Ringsubstituenten beteiligt (Storbeck *et al.*, 2011). Das Tyrosin an Position 134 wurde gegen Phenylalanin ausgetauscht und wird im Folgenden als Y134F bezeichnet. Das Tyrosin an Position 137 wurde durch Phenylalanin, Alanin bzw. Serin ersetzt und wird im Weiteren als Y137F, Y137A bzw. Y137S referiert. Das Argenin an Position 142 wurde zu einem Alanin mutiert und folglich als R142A betitelt. Hierbei sollte eine Mutation zu Alanin zu einer Inaktivität des Enzyms führen, wenn die mutierte Aminosäure an der Reaktion oder der Stabilisierung bzw. Bindung des Substrats oder Kofaktors beteiligt ist. Der Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin sollte sich kaum auf die Faltung der betreffenden α -Helix auswirken, da beide Aminosäuren sich nur in der fehlenden Hydroxylgruppe in der *ortho*-Position des Benzenrings bei Phenylalanin unterscheiden. Jedoch ist gerade die phenolische Hydroxygruppe häufig am Elektronentransport durch Tyrosine beteiligt. Falls dies der Fall sein sollte, sollte die Serin-Mutation darüber Aufschluss geben, da hier zwar der Phenolring im Vergleich zum Tyrosin fehlt, die Hydroxygruppe allerdings vorhanden ist. Für alle Mutanten wurde die PPO Aktivität mit Hilfe von zellfreien *E. coli* Extrakten, welche die *L. major* HemG Mutanten enthielten, gemessen, da sich die Aktivitäten nicht drastisch von denen des gereinigten Proteins unterschieden. Wie auch schon zuvor (Kapitel 3.3.2) wurde ein zellfreier Extrakt ohne *L. major* HemG als Kontrolle genutzt. Fumarat wurde als sekundärer Elektronenakzeptor eingesetzt. Die gemessenen Fluoreszenzeinheiten sind direkt proportional zum durch die Katalyse gebildeten Proto (Abbildung 41).

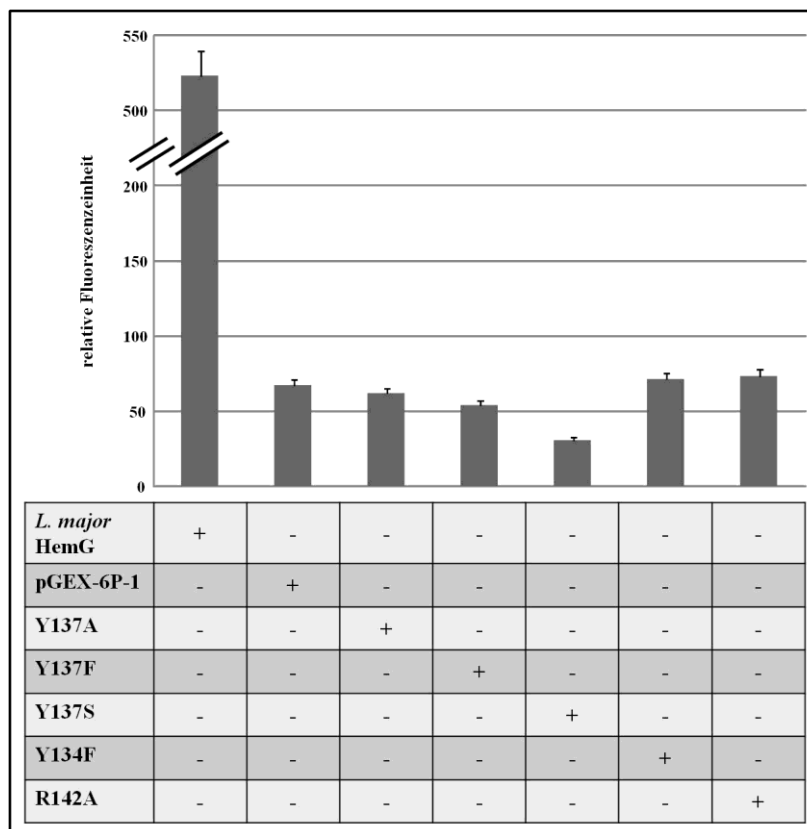


Abbildung 41: Protoporphyrinogen IX Oxidase-Aktivität der *Leishmania major* HemG-Mutanten. Der Aktivitätsassay wurde wie in Kapitel 2.7.11 beschrieben durchgeführt. Als Elektronenakzeptor diente Fumarat. Abgebildet ist die Fluoreszenz bei t= 60 min. T-bars geben die Standardabweichung für n = 3 an.

Zusätzlich zu den *in vitro* Studien wurden *in vivo* Studien durchgeführt. Hierfür wurde abermals der *hemG*-defiziente Stamm *E. coli* LG285 herangezogen und mit den mutierten *hemG*-Genen komplementiert. Die Änderungen in der Tetrapyrrolzusammensetzung wurden durch HPLC Analysen nachvollzogen. Abbildung 42 zeigt die gewonnenen HPLC Chromatogramme der getesteten *L. major* HemG Mutanten zwischen 23 und 43 Minuten Retentionszeit.

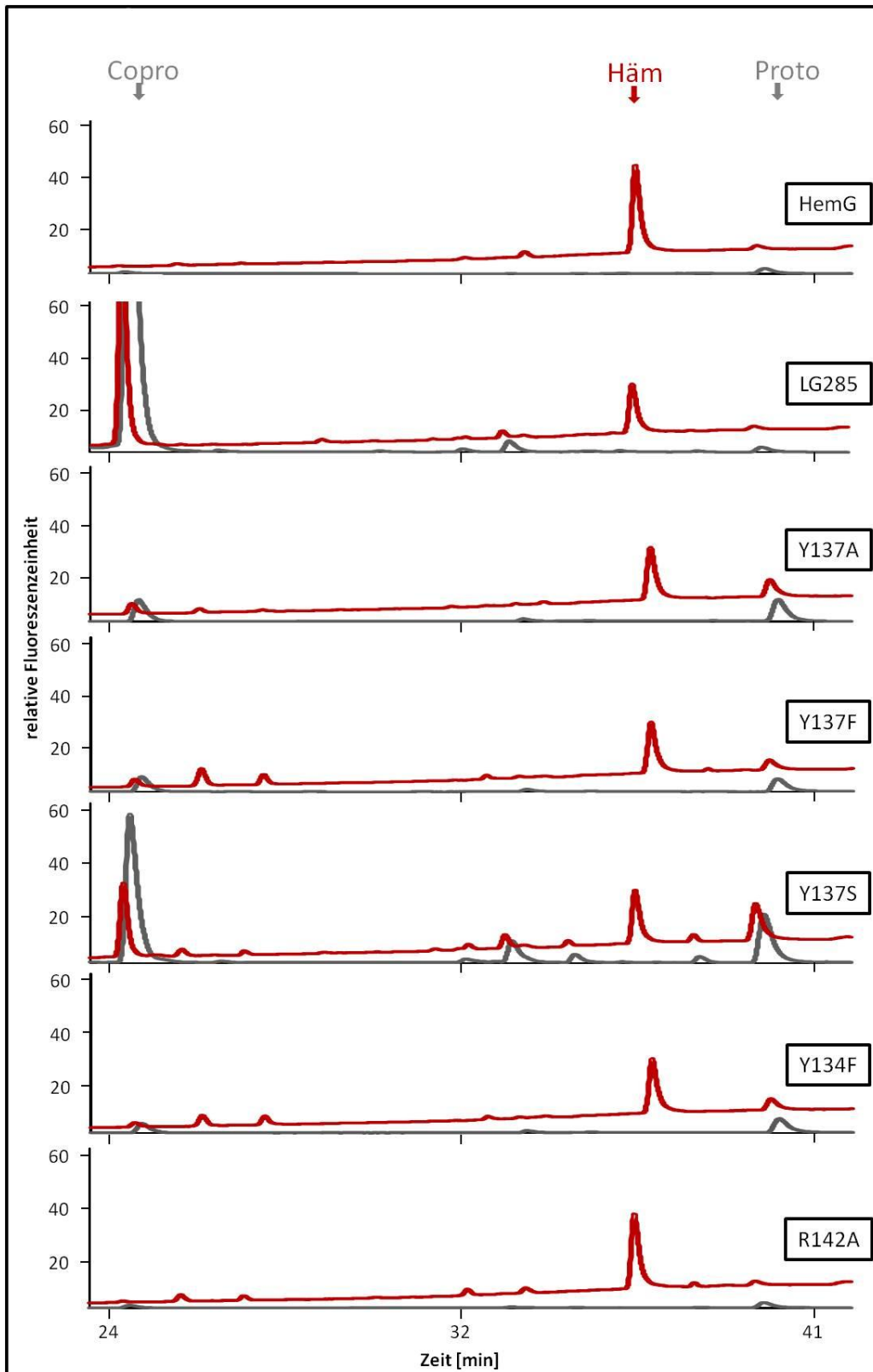


Abbildung 42: HPLC-Analyse zur Untersuchung der Auswirkung von Mutationen von HemG auf die Porphyrinzusammensetzung.

HemG Mutanten wurden in LG285 transformiert und wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben kultiviert. HPLC Analysen und Porphyrinaufbereitung wurden durchgeführt wie in Kapitel 2.7.13 beschrieben. Aufgetragen ist die Signalstärke gegen die Zeit in Minuten. Retentionszeit für Häm war 37.3 min., für Proto 40.7 min. und 25.6 min für Copro. Rot: UV/Vis-Chromatogramm; Grau: Fluoreszenzschromatogramm bei 630 nm nach Anregung mit 409 nm

Der Aktivitätstest von R142A zeigte eine um den Faktor 50 verringerte Aktivität der Mutante verglichen mit dem Wildtyp *L. major* HemG. Dennoch war eine geringe Restaktivität eindeutig messbar. In den zugehörigen HPLC-Läufen waren die Vorläufermoleküle Coprogen/Copro und Protogen/Proto nur in geringen Mengen, vergleichbar mit denen des Wildtyp *L. major* HemG, detektierbar. Jedoch war das Häm-Signal schwächer als im Wildtyp Chromatogramm. Diese Ergebnisse zusammengekommen deuten auf eine verlangsamte Reaktion der Mutante R142A hin. Dieser Effekt kann mit einer Substratbindung oder einer Protonenweiterleitung nach der Reaktion von R142A zusammenhängen. Auch die Mutante Y134F zeigte geringe PPO Restaktivität. Jedoch war im Chromatogramm ein deutlich schwächeres Signal für Häm erkennbar und eine Akkumulation von Coprogen/Copro und Protogen/Proto war ebenfalls ersichtlich. Hierbei handelte es sich möglicherweise um einen negativen Effekt auf die Weiterleitung der Elektronen, welche für die Reaktion von Protogen zu Proto essentiell ist. Da jedoch noch Restaktivität vorhanden war, scheint die mutierte Aminosäure Y134F wichtig, jedoch nicht essentiell zu sein. Ein Aminosäureaustausch an Position Y137 führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Wie zuvor schon bei der nicht komplementierten $\Delta hemG$ *E. coli* Mutante beobachtet kam es auch hier zu einer deutlichen Akkumulation der Häm-Vorläufermoleküle mit gleichzeitigen schwachen Häm-Signalen. Hierbei ähnelten sich die Chromatogramme von Y134F und Y137F stark, jedoch waren die Signalintensitäten für die Vorläufermoleküle bei Y137F höher (Copro/Coprogen 6.0 Fluoreszenzeinheiten (FU) bei Y134F zu 3.6 FU bei Y137F und Protogen/Proto 5.1 FU bei Y134F zu 5.5 FU bei Y137F) und somit auch die Konzentration an Vorläufermolekülen in dieser Probe. Den stärksten Effekt zeigte der Austausch von Y137S. Dies könnte in der unter diesen Umständen geringeren nukleophilen Reaktivität des Serins im Vergleich zum Tyrosin liegen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich die α -Helix aufgrund der geringeren räumlichen Ausbreitung von Serin gegenüber Tyrosin falsch oder nicht ausbildete und somit das katalytisch aktive Zentrum blockiert bzw. nicht vorhanden war. In diesem Falle wäre jedoch anzunehmen, dass ein gleicher Effekt auch für den Austausch von Tyrosin zu Alanin auftreten würde, allerdings wies dieser deutlich schwächere Folgen auf. Offensichtlich war hingegen, dass Tyrosin an Position 137 essentiell für die HemG Aktivität ist und somit eine entscheidende Bedeutung beim Elektronentransfer darstellt.

3.4 Charakterisierung der putativen Coproporphyrinogen III Oxidase YtpQ aus *Bacillus subtilis*

Bisher war es nicht möglich eine CPO Aktivität der vermutlichen CPO von *B. subtilis* HemN *in vitro* nachzuweisen (Homuth *et al.*, 1999). Deshalb ist unklar ob es sich bei dieser überhaupt um eine CPO handelt. Zudem fehlt bisher eine aerobe CPO in *B. subtilis*.

Neuere Untersuchungen lassen nun YtpQ als mögliche Kobalt-abhängige aerobe CPO von *B. subtilis* erscheinen. Aminosäuresequenzvergleiche von YtpQ mit den bisher bekannten CPO HemN und HemF zeigten keinerlei signifikante Sequenzidentitäten. Somit würde es sich bei YtpQ um eine bisher unbekannte CPO handeln. Ein Datenbankabgleich von YtpQ mit Genomen anderer Organismen zeigte, dass YtpQ einzig innerhalb der Bacillales vorhanden ist. So wies *B. subtilis* YtpQ 63 % Aminosäuresequenzhomologie mit GTNG_2723 (YP_001126813) *Geobacillus thermodenitrificans* sowie 52 % Aminosäuresequenzhomologie mit YtpQ von *S. aureus* (EKU08452) und *L. monocytogenes* (CDM20618) auf (Abbildung 43).



Aminosäure-Sequenzvergleich der putativen Coproporphyrinogen III Oxidasen YtpQ verschiedener Arten der Bacillales untereinander und mit den Coproporphyrinogen III Oxidasen HemN und HemF aus *Escherichia coli*. !: 100 % Sequenzübereinstimmung; *: ≥ 50 % Sequenzübereinstimmung; Heat-map oberhalb der Sequenzen entspricht Hydrophobizität..

Durch die zentrale Rolle der CPO im Häm-Metabolismus würde eine Inaktivierung dieser höchstwahrscheinlich zum Absterben des Organismus führen. Die Rolle von YtpQ als kobaltabhängige CPO wurde im Weiteren untersucht.

3.4.1 *Bacillus subtilis* YtpQ ist eine Coproporphyrinogen III Oxidase

B. subtilis ytpQ umfasst 810 bp und wurde in den pTrcHis A Überproduktionsvektor kloniert, was zur Erstellung des pTrcHis A-ytpQ_{B,s} Plasmids führte. Das Protein wurde in *E. coli* BL21(DE3) Zellen produziert und bis zu nahezu homogenem Protein aerob gereinigt. Die Reinigung erfolgte über 6 Schritte mit ansteigenden Imidazol-Konzentrationen über eine nickelchelatierte Sepharosechromatographiesäule. Das Fusionsprotein aus YtpQ mit His_{6x}-Tag wurde hierdurch isoliert. Abbildung 44 zeigt die Aufreinigungsschritte.

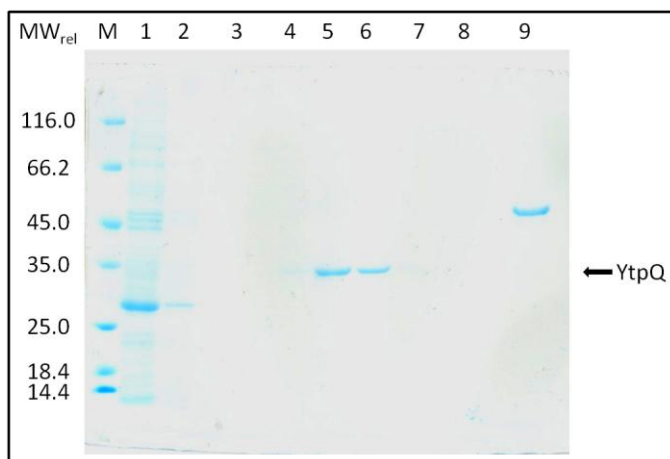


Abbildung 44: SDS-Polyacrylamidgel (12%) der Aufreinigung von *Bacillus subtilis* YtpQ.

Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE getrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung visualisiert. M: Proteingrößenmarker. Die relativen Molekülgrößen sind links aufgeführt. 1: Durchfluss; 2: Waschfraktion 3: Elutionsfraktion 100 mM Imidazol; 4: Elutionsfraktion 150 mM Imidazol; 5: Elutionsfraktion 200 mM Imidazol; 6: Elutionsfraktion 250 mM Imidazol; 7: Elutionsfraktion 300 mM Imidazol; 8: Elutionsfraktion 400 mM Imidazol; 9: Elutionsfraktion 500 mM Imidazol; dominante Bande unterhalb von 35 kDa in Fraktionen 5 und 6 zeigten YtpQ an.

Die SDS-PAGE Analyse des aufgereinigten Proteins zeigte eine deutliche Bande bei einer relativen molekularen Masse von ca. 29.000 +/- 5000. Dies ist entsprach annähernd der zuvor berechneten Molekülgröße von 31.043 kDa. Es konnten ca. 5 mg Protein/L Zellkultur produziert werden.

Mit dem gereinigten YtpQ wurden klassische Coproporphyrinogen III Oxidase Assays durchgeführt. Diese Assays beruhten auf den unterschiedlichen Fluoreszenzemissionsspektren der Porphyrine Copro und Proto nach Anregung des Fluorophors bei 409 nm. Die grundlegende Annahme lautete, dass bei einer aktiven

CPO das eingesetzte Coprogen zu Protogen umgewandelt werden würde. Da Protogen jedoch kein sichtbares Emissionsspektrum aufweist, aufgrund des fehlenden delokalisierten π -Elektronensystems, wurde es durch Zugabe von H_2O_2 in das rötliche fluoreszierende Proto umgewandelt. Das Fluoreszenzemissionsspektrum von Proto wurde nach Anregung des Fluorophors bei 409 nm bei 633 nm mittels eines Lumineszenzspektrometers nach 60 Minuten Inkubation aufgenommen. Bei einer inaktiven CPO würde das eingesetzte Coprogen durch die zuvor erwähnte Zugabe von H_2O_2 zu Copro oxidiert. Das Fluoreszenzemissionsspektrum von Copro konnte nach Anregung des Fluorophors bei 409 nm bei 618 nm mittels eines Lumineszenzspektrometers nach 60 Minuten Inkubation aufgenommen werden. Da beide Fluorophore mit der gleichen Wellenlänge angeregt werden können, und sich die Emissionswellenlängen deutlich unterscheiden, kann hierdurch die Aktivität der CPO bestimmt werden.

Für die anaeroben Assays wurde Ubichinon-1 als Elektronenakzeptor eingesetzt, sonst fungierte Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Wasserstoffperoxid wurde nach 30 Minuten Inkubationszeit zugegeben. Die Emissionsintensität wird im folgendem in Säulendiagrammen dargestellt, wobei diese die Intensität nach 30 Minuten nach Zugabe von Wasserstoffperoxid widerspiegeln. Aus Abbildung 45 geht hervor, dass YtpQ unter aeroben Bedingungen eine CPO-Aktivität aufwies. Diese ist verhältnismäßig schwach verglichen mit anderen CPO, aber dennoch eindeutig. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine vorherige Anaerobisierung des Enzyms zu einem Verlust der Aktivität führte.

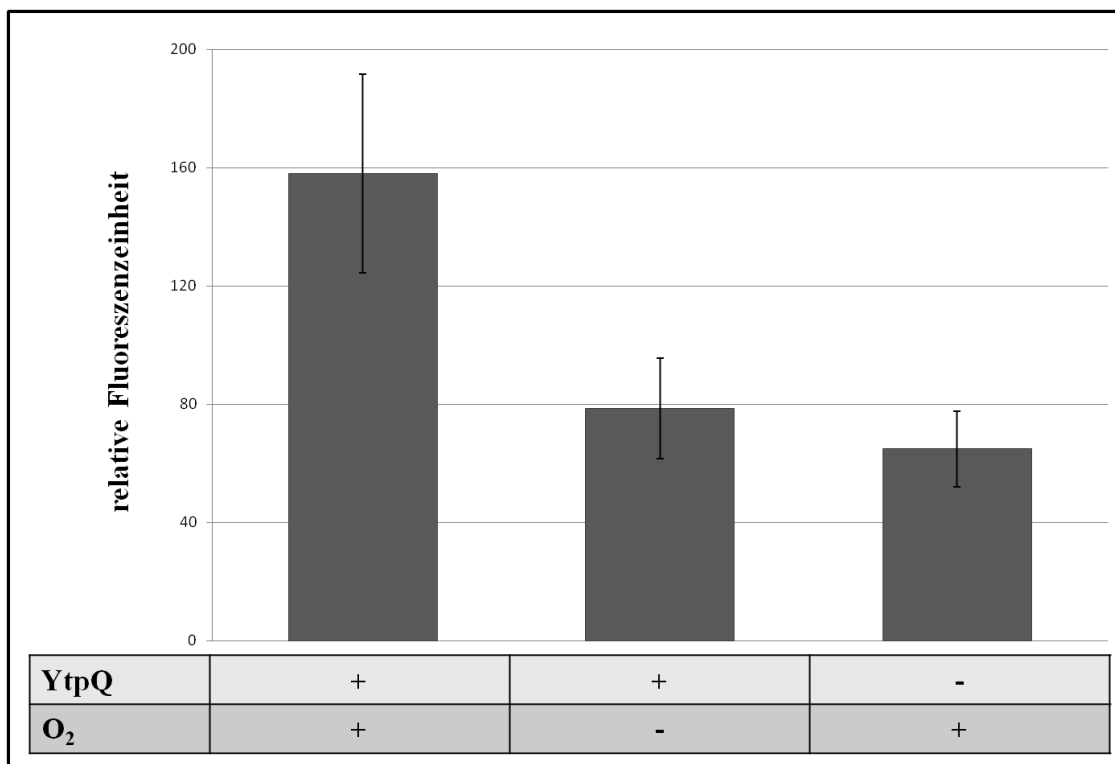


Abbildung 45: Coproporphyrinogen III Oxidase Aktivität von *Bacillus subtilis* YtpQ.

Der Aktivitätsassay wurde wie in Kapitel 2.7.12 beschrieben durchgeführt. Abgebildet ist die Fluoreszenz bei $t = 30$ min nach H_2O_2 Zugabe.

Die dargestellte Emission sowohl der Negativkontrolle als auch der anaeroben Probe lässt sich auf die Umwandlung zu Copro zurückführen. Die Emissionsspektren sowohl von Copro als auch von Proto sind relativ breit, sodass die Ausläufer des abnehmenden Copro Peaks bei 633 nm messbar sind. Hierdurch war sehr schwache Aktivität nicht bestimmbar. Aufgrund dessen wurden zusätzlich zu den Fluoreszenzemissionsspektren die gebildeten Porphyrine auch chromatographisch nachgewiesen. Hierzu wurde der oben beschriebene Aktivitätsassay nicht im Lumineszenzspektrometer vermessen, sondern die Porphyrine mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer reversed phase C18 Säule nachgewiesen. Chromatogramme der Fluorophore wurden bei 630 nm nach Anregung bei 409 nm aufgenommen um die Porphyrine nachzuweisen (Abbildung 46).

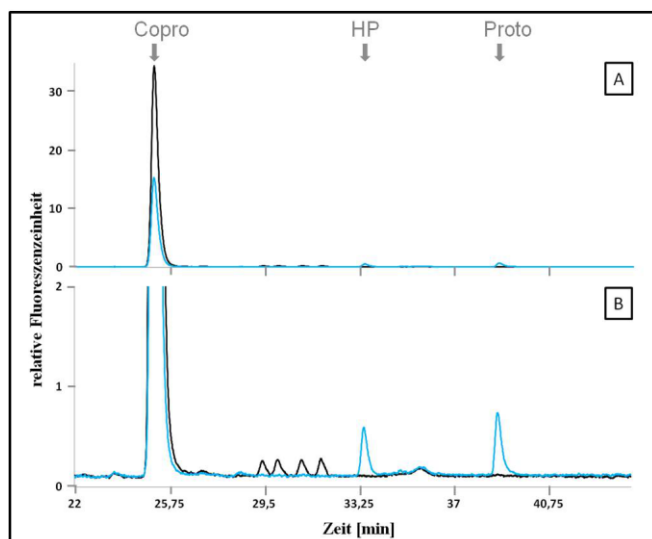


Abbildung 46: HPLC-Analyse der mittels HPLC getrennten Produkte des *in vitro* Aktivitätstests von gereinigtem rekombinantem *B. subtilis* YtpQ.

Der Aktivitätsassay wurde wie in Kapitel 2.7.12 beschrieben durchgeführt. HPLC Analysen wurden durchgeführt wie in Kapitel 2.7.13 beschrieben. Aufgetragen ist die Signalstärke gegen die Zeit in Minuten. Retentionszeit für Proto war 38.74 min, 32.45 min für HP und 25.125 min für Copro. Dargestellt sind Fluoreszenzschromatogramme bei 630 nm nach Anregung mit 409 nm. Schwarz: Kontrolle ohne YtpQ; Blau: Aktivitätstest mit YtpQ; A: HPLC-Analyse der gebildeten Porphyrine im Überblick; B vergrößerter Ausschnitt von A zur besseren Visualisierung der schwachen Signale.

Das Chromatogramm der YtpQ beinhaltenden Probe wies Signale bei den Retentionszeitpunkten 25.125 min, 32.45 min und 38.74 min auf. Die Signale konnten anhand von Standards durch die Retentionszeit als Copro, Harderoporphyrin (HP) sowie Proto identifiziert werden. Jedoch sind die Signale für HP und Proto in der YtpQ beinhaltenden Probe nur sehr schwach ausgeprägt, können aber dennoch als eindeutig angesehen werden, da weder Proto noch HP in der Negativkontrolle nachgewiesen werden konnten. Da es sich bei HP um die oxidierte Form des Harderoporphyrinogens, des typischen Zwischenprodukts der CPO Reaktion handelt, bei dem nur eine der beiden an Ring A und B befindlichen Propionat-Seitenketten decarboxyliert ist, weist dies eindeutig auf eine ablaufende CPO Reaktion hin. Es scheint sich also auch bei der durch YtpQ katalysierten Reaktion um einen zwei-stufigen Prozess zu handeln, wie er für die bereits bekannten CPO gezeigt wurde, da sonst HP nicht hätte nachgewiesen werden können. Zudem war das Copro Signal der YtpQ beinhaltenden Probe nur ca. halb so intensiv wie das der zugehörigen Negativkontrolle, was auf eine deutliche Konzentrationsabnahme von Copro hindeutet. Diese Abnahme war jedoch um ein vielfaches höher als die Zunahme an Zwischenprodukt und Produkt der Reaktion. Es kann spekuliert werden, dass eine gewisse Menge an Coprogen weiterhin im Enzym gebunden war und somit der Reaktion mit H_2O_2 entgangen ist. Eine andere Möglichkeit

diese Unterschiede zu erklären begründet sich in der Oxidation durch H_2O_2 . Schon in vorangegangenen Experimenten ist auffällig gewesen, dass deutlich bessere Umsetzungen, von in diesem Fall Protogen zu Proto, enzymkatalysiert erreicht wurden, als durch H_2O_2 . Dies könnte an den relativ harschen Bedingungen einer Umsetzung mit H_2O_2 liegen, bei der eine weiterführende Oxidation zu anderen Porphyrinen oder gar linearen Tetrapyrrolen nicht ausgeschlossen werden kann. Diese können unter den gewählten Bedingungen nicht chromatographisch nachgewiesen werden, sodass auch bei der Oxidation durch H_2O_2 ein Teil des bei der CPO Reaktion entstandenen Protogens eventuell der Detektion entgangen ist. Dennoch scheint YtpQ eher schwache CPO-Aktivität vorzuweisen. Dies könnte in einem fehlenden, allerdings für die Reaktion wichtigen Kofaktor begründet sein.

3.4.2 Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen Metallkofaktors von YtpQ

Um einen möglichen Kofaktor von YtpQ zu identifizieren wurde zunächst die Proteinstruktur untersucht. Die Sekundärstrukturanalyse zeigte eine gemischte $\alpha+\beta$ -Struktur der Form $\alpha-\beta-\beta-\beta-\alpha-\alpha-\beta-\beta-\beta-\alpha-\alpha-\beta-\alpha-\beta-\beta-\alpha-\beta-\beta$, wobei α für eine α -Helix steht und β ein β -Faltblattstrang repräsentiert. Der C-Terminus schien sich hierbei eventuell in eine RRF Domänen ähnliche Struktur der Form $\alpha-\beta-\beta-\alpha-\beta-\beta$ zu falten. Es könnte sich jedoch auch um eine Ferredoxin ähnliche Struktur des Musters $\beta-\alpha-\beta-\beta-\alpha-\beta$ handeln. Da bisher keine Proteinstrukturen von YtpQ oder sequenziell ähnlichen Proteinen gelöst wurden ist die Vorhersage von tertiären oder gar quartären Strukturen nur in Ansätzen möglich, zumal die meisten Programme zur Proteinstrukturvorhersage auf einer Homologiemodellierung beruhen. Dies erschwerte auch die Vorhersage von möglicherweise benötigten Kofaktoren. Ein Versuch zur *ab initio* Modellierung wurde durchgeführt, welcher in zwei Modellen mit je 200 bzw. 198 Aminosäuren resultierte. In Abbildung 47 sind beide Modelle abgebildet und die überlappenden Sequenzen farblich gekennzeichnet. Jedoch lieferten auch diese Modelle keine Vorhersage zu etwaigen Kofaktorbindestellen.

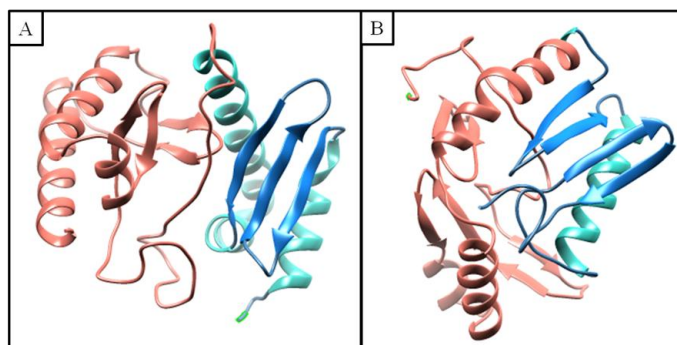


Abbildung 47: Proteinmodell von YtpQ.

A: Proteinmodell der N-terminalen 200 Aminosäuren; B: Proteinmodell der C-terminalen 198 Aminosäuren. Lachsfarbend: Struktur der überlappenden Sequenz

In anderen aeroben CPO's konnte zum Teil ein divalentes Metallion als Kofaktor nachgewiesen werden. Vorrangegangene Experimente mit YtpQ deuteten auf Kobalt als möglichen Kofaktor hin (Dailey, 2013). Kobalt bindet typischerweise Cysteine oder Histidine. Es konnten jedoch keine Metallbindenden Regionen ausgehend von der Aminosäuresequenz ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht den möglichen Metallkofaktor durch Zugabe von EDTA bzw. EGTA zu chelatieren und anschließend durch Zugabe eines Metallsalzes die Funktionalität in Abhängigkeit des darin befindlichen Metalles zu analysieren. Hierbei ist zu beachten, dass EDTA und EGTA zwar beide divalente Metallionen chelatieren, jedoch bekannt ist, dass dieser Effekt unterschiedlich stark für bestimmte Metalle ist. So bildet EDTA mit Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} und Co^{2+} besonders stabile Chelatkomplexe, wohingegen Ca^{2+} und Mg^{2+} mit einer höheren Affinität durch EGTA gebunden werden. Das Protein denaturierte jedoch nach Zugabe der Metallsalze, sodass eine weiterführende Analyse nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde eine Aktivitätssteigerung von YtpQ durch Zugabe von Kobaltchlorid ohne vorherige Behandlung der Probe mit EDTA oder EGTA untersucht. Jedoch führten auch hier schon geringe Mengen von $10 \mu\text{M}$ CoCl_2 zur Denaturierung des Proteins, was einem Zehntel der im Dailey-Labor zur Aktivitätssteigerung eingesetzten Kobalt-Konzentration entsprach. Da Kobalt auch in Vitamin B12 chelatiert ist und dieses häufig als Kofaktor dient, wurde im Weiteren versucht die Aktivität von YtpQ durch Zugabe von Vitamin B12 zu steigern. Jedoch führte auch dies zur Denaturierung des Proteins. Da die aufgezählten experimentellen Ansätze zu keinen zufriedenstellenden Resultaten führten, wurde eine Massenspektrometrie mit gekoppelter Plasma (ICP-MS) Messung des aktiven Proteins bei der Firma Currenta in Auftrag gegeben. Durch diese Methode konnten Metalle im 100 ng pro kg Bereich

nachgewiesen werden. Die Analyse ergab im Bereich von 0,1 - 1 mg pro kg Probe Kalzium und Nickel und im Bereich von 10 - 100 mg pro kg Probe Natrium. Bei den großen Mengen an Natrium handelte es sich um einen Eintrag durch den Puffer in dem das Protein gelöst ist, welcher gelöste Natriumsalze enthält. Durch die zur Einstellung des pH-Werts des Puffers verwendeten Chemikalien, welche scheinbar mit Leitungswasser oder nicht vollständig deionisierten Wasser hergestellt wurden, lässt sich die geringe Menge an Kalzium in der Probe erklären. Da YtpQ über eine Nickel-chelatierte Sepharose aufgereinigt wurde, handelte es sich bei den Spuren von Nickel in der Probe höchstwahrscheinlich um bei der Reinigung von der Säule gewaschene Nickelionen. Da auch durch diese sehr sensitive Methode keine Metallkofaktoren in YtpQ gefunden werden konnten, wird vermutet, dass es sich bei einem eventuellen Kofaktor von YtpQ nicht um ein Metallion handelt, oder dieses bei der Aufbereitung der Probe aus dem Protein gewaschen wurde.

Falls die geringe Reaktivität von YtpQ nicht auf einen fehlenden Kofaktor zurückzuführen ist, könnte diese auch an den gewählten Assaybedingungen liegen. Der pH-Wert des zur Solubilisierung des Proteins verwendeten Puffers liegt im neutral-leicht basischen Bereich. Der Literatur ist allerdings zu entnehmen, dass *in vivo ytpQ* Expression durch den globalen Stressantwort Regulator Spx aktiviert wird. Spx wird durch Stress aufgrund von Disulfiden und toxischen Substanzen, wie Stickstoffmonoxid, die Zellwand beeinflussende Agenzien, toxischen Elektrophilen und hypochlorige Säure induziert (Zuber *et al.*, 2011). Dies lässt darauf schließen, dass YtpQ vornehmlich unter Stressbedingungen aktiv sein könnte, als Antwort auf vor allem oxidativen und elektrophilen Stress, der häufig mit einer Ansäuerung des Zytoplasmas einhergeht. Daher ist zu vermuten, dass YtpQ eventuell nur unter sauren Bedingungen vollständig aktiv ist, wodurch der rasche Aktivitätsverlust bei Lagerung in leicht basischen Puffern erklärt werden könnte. Falls diese Annahme zutrifft und es sich bei YtpQ um eine durch Stress induzierte CPO von *B. subtilis* handelt, wäre sie ein idealer Angriffspunkt für neue Medikamente in Kombination mit Antibiotika, da auch Antibiotika häufig eine Stressantwort hervorrufen.

4 Zusammenfassung

Der Biosyntheseweg von Häm galt lange Zeit als hochkonserviert zwischen allen Reichen des Lebens. Jedoch zeigten Genomsequenzanalysen verschiedener Organismen, welche Häm bilden, dass bisher bekannte Gene der Häm-Biosynthese fehlten. Hierbei handelte es sich vor allem um Gene, welche für die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO) und Coproporphyrinogen III Oxidase (CPO) codieren. Einer dieser Organismen mit ungewöhnlicher Häm-Biosynthese ist *Leishmania* spp.. Es weist einen verkürzten Biosyntheseweg auf, welcher nur aus den letzten drei Genen des Syntheseweges (CPO, PPO und FC) besteht. In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivität der PPO, welche zum HemG-Typ zählt experimentell nachgewiesen werden. Dies gelang zum einen *in vivo* über Komplementationsstudien mit einer Δ hemG *E. coli* Mutante und zum anderen *in vitro* mit gereinigtem *L. major* HemG Protein. Des Weiteren konnte die Kopplung der PPO an die Atmungskette von *E. coli* aufgezeigt werden. Zudem wurde FMN als Kofaktor identifiziert. Basierend auf einem Strukturmodell sowie *in vivo* und *in vitro* Experimenten konnte für die Aminosäurereste Y134, Y137 und R142 eine Beteiligung an der Katalyse der durch die PPO katalysierten Reaktion gezeigt werden. Dabei war der Effekt für Y137 am stärksten ausgeprägt. Dies stellt die erste Charakterisierung einer PPO des HemG-Types in Eukaryoten dar.

Zusätzlich hierzu wurde auch die potentielle CPO YtpQ aus *B. subtilis* untersucht. Es gelang YtpQ rekombinant zu produzieren und die CPO Aktivität erstmals zu beweisen. Zudem gelang es, das in dieser 2-stufigen Reaktion gebildete Intermediat Haderoporphyrinogen in seiner oxidierten Form Harderoporpyrin nachzuweisen. Ein möglicher Metallkofaktor, wie das vermutete Kobalt, konnte nicht identifiziert werden. Zusammengefasst, konnten in dieser Arbeit zwei neuartige Enzymtypen der Häm-Biosynthese erstmals identifiziert und charakterisiert werden.

5 Ausblick

Im Falle von *L. major* HemG, würde eine Lösung der Kristallstruktur von großem Interesse sein. Zudem wäre eine weitere Analyse der katalytisch aktiven Proteinregion ein entscheidender Schritt in Richtung Medikamentenentwicklung, wobei zuvor der eindeutige Nachweis der verkürzten Häm-Biosynthese in *Leishmania* spp. Amastigoten erbracht werden müsste.

B. subtilis YtpQ sollte hinsichtlich seiner Stabilität sowie Aktivität verbessert werden. Hierbei scheint die richtige Wahl des Puffers von entscheidender Bedeutung, welcher durch ThermoFluor Analysen optimiert werden könnte. Zudem wären *in vivo* Analysen interessant, bei welchem die These der CPO Aktivität unter Stressbedingungen getestet werden könnte. Auch hier wäre eine Kristallstruktur von großer Bedeutung, vor allem vor dem Hintergrund, dass YtpQ zu keiner bisher gelösten Kristallstruktur homolog ist und somit eine neue Klasse von Enzymen darstellen könnte.

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: IN DER ARBEIT VERWENDETE GERÄTE.....	28
TABELLE 2: IN DER ARBEIT VERWENDETE <i>E. COLI</i> STÄMME	30
TABELLE 3: IN DER ARBEIT VERWENDETE PLASMIDE	32
TABELLE 4: IN DER ARBEIT VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	34
TABELLE 5: IN DIESER ARBEIT GENUTZTE ADDITIVA	37

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DER PORPHYRINRING, DIE GRUNDSTRUKTUR ZYKLISCHER TETRAPYRROLE.....	2
ABBILDUNG 2: TYPEN DER TETRAPYRROLE AUSGEHEND VOM LETZTEN GEMEINSAMEN VORSTUFENMOLEKÜL, UROPORPHYRINOGEN III.	3
ABBILDUNG 3: DIE HÄM-BIOSYNTHESE.....	5
ABBILDUNG 4: 2-STUFIGE REAKTION DER COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE.	8
ABBILDUNG 5: KRISTALLSTRUKTUR DER COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE HEMF VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	9
ABBILDUNG 6: MÖGLICHER REAKTIONSMECHANISMUS DER SAUERSTOFFABHÄNGIGEN COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE.	10
ABBILDUNG 7: KRISTALLSTRUKTUR DER SAUERSTOFFUNABHÄNGIGEN COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE HEMN VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	11
ABBILDUNG 8: REAKTIONSMECHANISMUS DER SAUERSTOFFUNABHÄNGIGEN COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE.....	12
ABBILDUNG 9: KRISTALLSTRUKTUR DER SAUERSTOFFABHÄNGIGEN PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE HEMY AUS <i>MYXOCOCCUS XANTHUS</i>	15
ABBILDUNG 10: SCHEMA DES SUBSTRATCHANNELINGS DER PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE ZUR FERROCHELATASE.	16
ABBILDUNG 11: PROTEINMODELL DER SAUERSTOFFUNABHÄNGIGEN PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE HEMG VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	17
ABBILDUNG 12: MODELL DER PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE GEKOPPELTEN ELEKTRONENTRANSFERREAKTIONEN UND DER ATP-GENERIERUNG IN <i>ESCHERISCHIA COLI</i>	18

ABBILDUNG 13: ÜBERBLICK ÜBER ENDEMIEGEBIETE DER LEISHMANIOSE.	19
ABBILDUNG 14: INFEKTIONSZYKLUS VON LEISHMANIA.....	21
ABBILDUNG 15: PHÄNOTYPISCHE AUSPRÄGUNGEN VON LEISHMANIA.	23
ABBILDUNG 16: MODELL DER HÄM-BIOSYNTHESE VON <i>LEISHMANIA MAJOR</i> IN MAKROPHAGEN.	26
ABBILDUNG 17: BSA EICHGERADE ZUR KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN.....	46
ABBILDUNG 18: PROTOPORPHYRINOGEN EICHGERADE ZUR KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTO.....	48
ABBILDUNG 19: VERLAUF DES HPLC-GRADIENTEN.	51
ABBILDUNG 20: WACHSTUM DER Δ HEMG MUTANTE <i>E. COLI</i> LG285 IN ABHÄNGIGKEIT VON HÄMIN.....	55
ABBILDUNG 21: WACHSTUM DER Δ HEMG MUTANTE <i>E. COLI</i> SASX38 IN ABHÄNGIGKEIT VON HÄMIN.	55
ABBILDUNG 22: AKKUMULATION VON PORPHYRINEN WÄHREND DES WACHSTUMS DES Δ HEMG-STAMMES <i>E. COLI</i> LG285.....	56
ABBILDUNG 23: WACHSTUMSKINETIK DER Δ HEMG MUTANTE <i>E. COLI</i> LG285 KOMPLEMENTIERT MIT <i>HEMJ</i>	58
ABBILDUNG 24: HPLC-ANALYSE DER PORPHYRINZUSAMMENSETZUNG VON <i>E. COLI</i> LG285 <i>HEMJ</i>	59
ABBILDUNG 25: HPLC-ANALYSE DER PORPHYRINZUSAMMENSETZUNG VON <i>E. COLI</i> LG285 C6.....	61
ABBILDUNG 26: VERLAUFSSCHEMA DES DIFFERENTIELLEN GENOMVERGLEICHS.	63
ABBILDUNG 27: HPLC-ANALYSE DER PORPHYRINZUSAMMENSETZUNG VON <i>E. COLI</i> LG285 PA5028.	64
ABBILDUNG 28: GENORGANISATION DES LMJF_06_1280 ENTHALTENDEN OFFENEN LESERASTERS.....	66
ABBILDUNG 29: SEQUENZANALYSE VON <i>L. MAJOR</i> HEMG.	68
ABBILDUNG 30: WACHSTUM DER Δ HEMG MUTANTE <i>E. COLI</i> LG285 NACH KOMPLEMENTATION MIT LMJF_06_1280 cDNA.	69
ABBILDUNG 31: EINFLUSS DES VEKTORS pGEX AUF DAS WACHSTUM DER Δ HEMG MUTANTE <i>E. COLI</i> LG285 NACH KOMPLEMENTATION MIT LMJF_06_1280 cDNA.	70

ABBILDUNG 32: VERVOLLSTÄNDIGTE HÄM-BIOSYNTHESE VON <i>E. COLI</i> LG285 NACH KOMPLEMENTATION MIT <i>L. MAJOR</i> LMJF_06_1280 cDNA.	71
ABBILDUNG 33: FLUORESCENZSPEKTREN DER PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE- AKTIVITÄT VON <i>E. COLI</i> OVEREXPRESS(TM)C43(DE3), IN WELCHEN <i>LEISHMANIA</i> <i>MAJOR</i> HEMG ÜBERPRODUZIERT WURDE.	74
ABBILDUNG 34: PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE-AKTIVITÄT VON <i>E. COLI</i> OVEREXPRESS(TM)C43(DE3) IN WELCHEN <i>LEISHMANIA MAJOR</i> HEMG ÜBERPRODUZIERT WURDE.	75
ABBILDUNG 35: SDS-POLYACRYLAMIDGEL (12%) DER REINIGUNG VON <i>LEISHMANIA</i> <i>MAJOR</i> HEMG.	77
ABBILDUNG 36: PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE-AKTIVITÄT DES GEREINIGTEN <i>LEISHMANIA MAJOR</i> HEMG.....	78
ABBILDUNG 37: UV/VIS-CHROMATOGRAMM DER ELUTION VON <i>LEISHMANIA MAJOR</i> HEMG.	79
ABBILDUNG 38: FLAVINHALTIGE PROTEINFRAKTION VON <i>LEISHMANIA MAJOR</i> HEMG.	79
ABBILDUNG 39: CHROMATOGRAMME DES <i>L. MAJOR</i> HEMG KOFAKTORS.	80
ABBILDUNG 40: PROTEINMODELL VON <i>L. MAJOR</i> HEMG.	81
ABBILDUNG 41: PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE-AKTIVITÄT DER <i>LEISHMANIA MAJOR</i> HEMG-MUTANTEN.....	83
ABBILDUNG 42: HPLC-ANALYSE ZUR UNTERSUCHUNG DER AUSWIRKUNG VON MUTATIONEN VON HEMG AUF DIE PORPHYRINZUSAMMENSETZUNG.	84
ABBILDUNG 43: SEQUENZANALYSE VON <i>B. SUBTILIS</i> YTPQ.	87
ABBILDUNG 44: SDS-POLYACRYLAMIDGEL (12%) DER AUFREINIGUNG VON <i>BACILLUS SUBTILIS</i> YTPQ.....	88
ABBILDUNG 45: COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE AKTIVITÄT VON <i>BACILLUS SUBTILIS</i> YTPQ.....	90
ABBILDUNG 46: HPLC-ANALYSE DER MITTELS HPLC GETRENNTEN PRODUKTE DES <i>IN VITRO</i> AKTIVITÄTSTESTS VON GEREINIGTEM REKOMBINANTEM <i>B. SUBTILIS</i> YTPQ.	91
ABBILDUNG 47: PROTEINMODELL VON YTPQ.....	93

Literaturverzeichnis

1. **Akilov, O. E., S. Kosaka, K. O'Riordan und T. Hasan** (2007). "Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells." *Experimental dermatology* **16**(8): 651-660.
2. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman** (1990). "Basic local alignment search tool." *Journal of molecular biology* **215**(3): 403-410.
3. **Ausubel, F. M.** (2009). *Current Protocols in Molecular Biology: Chapter 26-29, Appendices, Supplement Index, Main Index*, Wiley.
4. **Battersby, A. R.** (2000). "Tetrapyrroles: the pigments of life." *Natural product reports* **17**(6): 507-526.
5. **Berek, I., A. Miczak, I. Kiss, G. Ivanovics und I. Durko** (1975). "Genetic and biochemical analysis of haemin dependent mutants of *Bacillus subtilis*." *Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **22**(2): 157-167.
6. **Bertani, G.** (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *Journal of bacteriology* **62**(3): 293-300.
7. **Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli und T. Schwede** (2014). "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information." *Nucleic acids research*: 1-7.
8. **Biskup, T., B. Paulus, A. Okafuji, K. Hitomi, E. D. Getzoff, S. Weber und E. Schleicher** (2013). "Variable electron transfer pathways in an amphibian cryptochrome: tryptophan versus tyrosine-based radical pairs." *The Journal of biological chemistry* **288**(13): 9249-9260.
9. **Boynton, T. O., L. E. Daugherty, T. A. Dailey und H. A. Dailey** (2009). "Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity." *Biochemistry* **48**(29): 6705-6711.
10. **Boynton, T. O., S. Gerdes, S. H. Craven, E. L. Neidle, J. D. Phillips und H. A. Dailey** (2011). "Discovery of a gene involved in a third bacterial protoporphyrinogen oxidase activity through comparative genomic analysis and functional complementation." *Applied and environmental microbiology* **77**(14): 4795-4801.
11. **Breckau, D., E. Mahlitz, A. Sauerwald, G. Layer und D. Jahn** (2003). "Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) from *Escherichia coli* is stimulated by manganese." *The Journal of biological chemistry* **278**(47): 46625-46631.
12. **Burchmore, R. J. und M. P. Barrett** (2001). "Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*." *International journal for parasitology* **31**(12): 1311-1320.
13. **Burns, C. M., H. L. Chan und M. S. DuBow** (1990). "In vitro maturation and encapsidation of the DNA of transposable Mu-like phage D108." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(16): 6092-6096.
14. **Carvalho, S., T. Cruz, N. Santarem, H. Castro, V. Costa und A. M. Tomas** (2009). "Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes." *Acta tropica* **109**(2): 131-135.

15. **Chang, C. K. und W. Wu** (1986). "The porphinedione structure of heme *dI*. Synthesis and spectral properties of model compounds of the prosthetic group of dissimilatory nitrite reductase." *The Journal of biological chemistry* **261**(19): 8593-8596.
16. **Chang, C. S. und K. P. Chang** (1985). "Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*." *Molecular and biochemical parasitology* **16**(3): 267-276.
17. **Clowes, R. C. H. W.** (1968). *Experiments in microbial genetics*. Oxford; Edinburgh, Blackwell Scientific Publications.
18. **Cornelis, P. und J. Dingemans** (2013). "*Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections." *Frontiers in cellular and infection microbiology* **3**: 1-7.
19. **Corradi, H. R., A. V. Corrigan, E. Boix, C. G. Mohan, E. D. Sturrock, P. N. Meissner und K. R. Acharya** (2006). "Crystal structure of protoporphyrinogen oxidase from *Myxococcus xanthus* and its complex with the inhibitor acifluorfen." *The Journal of biological chemistry* **281**(50): 38625-38633.
20. **Cunningham, A. C.** (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." *Experimental and molecular pathology* **72**(2): 132-141.
21. **Dailey, H. A.** (2013). YtpQ. schriftliche Korrespondenz
22. **Dailey, H. A. und T. A. Dailey** (1996a). "Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*. Expression, purification, and characterization of the cloned enzyme." *The Journal of biological chemistry* **271**(15): 8714-8718.
23. **Dailey, H. A. und S. W. Karr** (1987). "Purification and characterization of murine protoporphyrinogen oxidase." *Biochemistry* **26**(10): 2697-2701.
24. **Dailey, T. A., T. O. Boynton, A. N. Albetel, S. Gerdes, M. K. Johnson und H. A. Dailey** (2010). "Discovery and Characterization of HemQ: an essential heme biosynthetic pathway component." *The Journal of biological chemistry* **285**(34): 25978-25986.
25. **Dailey, T. A. und H. A. Dailey** (1996b). "Human protoporphyrinogen oxidase: expression, purification, and characterization of the cloned enzyme." *Protein science : a publication of the Protein Society* **5**(1): 98-105.
26. **Dammeyer, T. und N. Frankenberg-Dinkel** (2008). "Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms." *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **7**(10): 1121-1130.
27. **Davis, A. J. und L. Kedzierski** (2005). "Recent advances in antileishmanial drug development." *Current opinion in investigational drugs* **6**(2): 163-169.
28. **de Boer, H. A., L. J. Comstock und M. Vasser** (1983). "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**(1): 21-25.
29. **Diez, B., R. Cordo Russo, M. J. Teijo, S. Hajos, A. Batlle und H. Fukuda** (2009). "Ros production by endogenously generated Protoporphyrin IX in murine leukemia cells." *Cellular and molecular biology* **55**(2): 15-19.
30. **Emerson, R.** (1929). "Chlorophyll Content and Rate of Photosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **15**(3): 281-284.
31. **Ferreira, G. C., T. L. Andrew, S. W. Karr und H. A. Dailey** (1988). "Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex." *The Journal of biological chemistry* **263**(8): 3835-3839.

32. **Fleming, I. A. N.** (1967). "Absolute Configuration and the Structure of Chlorophyll." *Nature* **216**(5111): 151-152.
33. **Franklin, E. M., S. Browne, A. M. Horan, K. Inomata, M. A. Hammam, H. Kinoshita, T. Lamparter, G. Golfis und T. J. Mantle** (2009). "The use of synthetic linear tetrapyrroles to probe the verdin sites of human biliverdin-IXalpha reductase and human biliverdin-IXbeta reductase." *The FEBS journal* **276**(16): 4405-4413.
34. **Frere, F., W. D. Schubert, F. Stauffer, N. Frankenberg, R. Neier, D. Jahn und D. W. Heinz** (2002). "Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with 5-fluorolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism." *Journal of molecular biology* **320**(2): 237-247.
35. **Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of molecular biology* **166**(4): 557-580.
36. **Handman, E. und D. V. Bullen** (2002). "Interaction of Leishmania with the host macrophage." *Trends in parasitology* **18**(8): 332-334.
37. **Hansson, M. und L. Hederstedt** (1992). "Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* hemEHY gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes." *Journal of bacteriology* **174**(24): 8081-8093.
38. **Hansson, M. und L. Hederstedt** (1994). "*Bacillus subtilis* HemY is a peripheral membrane protein essential for protoheme IX synthesis which can oxidize coproporphyrinogen III and protoporphyrinogen IX." *Journal of bacteriology* **176**(19): 5962-5970.
39. **Hansson, M., L. Rutberg, I. Schroder und L. Hederstedt** (1991). "The *Bacillus subtilis* hemAXCDBL gene cluster, which encodes enzymes of the biosynthetic pathway from glutamate to uroporphyrinogen III." *Journal of bacteriology* **173**(8): 2590-2599.
40. **Harbury, H. A. und P. A. Loach** (1959). "Linked Functions in Heme Systems: Oxidation-Reduction Potentials and Absorption Spectra of a Heme Peptide Obtained Upon Peptic Hydrolysis of Cytochrome C." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **45**(9): 1344-1359.
41. **Hayes, S. und C. Hayes** (1978). "Control of lambda repressor prophage and establishment transcription by the product of gene tof." *Molecular & general genetics : MGG* **164**(1): 63-76.
42. **Heinemann, I. U., M. Jahn und D. Jahn** (2008). "The biochemistry of heme biosynthesis." *Archives of biochemistry and biophysics* **474**(2): 238-251.
43. **Hippler, B., G. Homuth, T. Hoffmann, C. Hungerer, W. Schumann und D. Jahn** (1997). "Characterization of *Bacillus subtilis* hemN." *Journal of bacteriology* **179**(22): 7181-7185.
44. **Holl, A. und W. Rüdiger** (1975). "Micromatabilin, a new biliverdin conjugate in the spider, *Micromata rosea* (Sparassidae)." *Journal of comparative physiology* **98**(2): 189-191.
45. **Homuth, G., A. Rompf, W. Schumann und D. Jahn** (1999). "Transcriptional control of *Bacillus subtilis* hemN and hemZ." *Journal of bacteriology* **181**(19): 5922-5929.
46. **Huynh, C., X. Yuan, D. C. Miguel, R. L. Renberg, O. Protchenko, C. C. Philpott, I. Hamza und N. W. Andrews** (2012). "Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1." *PLoS pathogens* **8**(7): 1-14.

47. **Ilag, L. L., D. Jahn, G. Eggertsson und D. Soll** (1991). "The *Escherichia coli* *hemL* gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase." *Journal of bacteriology* **173**(11): 3408-3413.
48. **Jackson, A. H., D. M. Jones, G. Philip, T. D. Lash, A. M. Batlle und S. G. Smith** (1980). "Synthetic and biosynthetic studies of porphyrins, Part IV. Further studies of the conversion of coproporphyrinogen-III to protoporphyrin-IX: mass spectrometric investigations of the incubation of specifically deuteriated coproporphyrinogen-III with chicken red cell haemolysates." *The International journal of biochemistry* **12**(5-6): 681-688.
49. **Jacobs, J. M. und N. J. Jacobs** (1987). "Oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin, a step in chlorophyll and haem biosynthesis. Purification and partial characterization of the enzyme from barley organelles." *The Biochemical journal* **244**(1): 219-224.
50. **Jacobs, N. J. und J. M. Jacobs** (1975). "Fumarate as alternate electron acceptor for the late steps of anaerobic heme synthesis in *Escherichia coli*." *Biochemical and biophysical research communications* **65**(1): 435-441.
51. **Kato, K., R. Tanaka, S. Sano, A. Tanaka und H. Hosaka** (2010). "Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(38): 16649-16654.
52. **Kaufholz, A. L., G. A. Hunter, G. C. Ferreira, T. Lendrihas, V. Hering, G. Layer, M. Jahn und D. Jahn** (2013). "Aminolaevulinic acid synthase of *Rhodobacter capsulatus*: high-resolution kinetic investigation of the structural basis for substrate binding and catalysis." *The Biochemical journal* **451**(2): 205-216.
53. **Klemm, D. J. und L. L. Barton** (1987). "Purification and properties of protoporphyrinogen oxidase from an anaerobic bacterium, *Desulfovibrio gigas*." *Journal of bacteriology* **169**(11): 5209-5215.
54. **Koch, M., C. Breithaupt, R. Kiefersauer, J. Freigang, R. Huber und A. Messerschmidt** (2004). "Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis." *The EMBO journal* **23**(8): 1720-1728.
55. **Kohno, H., T. Furukawa, R. Tokunaga, S. Taketani und T. Yoshinaga** (1996). "Mouse coproporphyrinogen oxidase is a copper-containing enzyme: expression in *Escherichia coli* and site-directed mutagenesis." *Biochimica et biophysica acta* **1292**(1): 156-162.
56. **Koreny, L., J. Lukes und M. Obornik** (2010). "Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all?" *International journal for parasitology* **40**(2): 149-156.
57. **Koreny, L., M. Obornik und J. Lukes** (2013). "Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites." *PLoS pathogens* **9**(1): 1-6.
58. **Kozarich, J. W.** (1988). "S-adenosylmethionine-dependent enzyme activation." *BioFactors* **1**(2): 123-128.
59. **Kühner, M., K. Haufschildt, A. Neumann, S. Storbeck, J. Streif und G. Layer** (2014). "The alternative route to heme in the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri*." *Archaea* **2014**: 1-13.
60. **Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

61. Laskay, T., G. van Zandbergen und W. Solbach (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?" Trends in microbiology **11**(5): 210-214.
62. Layer, G., K. Grage, T. Teschner, V. Schunemann, D. Breckau, A. Masoumi, M. Jahn, P. Heathcote, A. X. Trautwein und D. Jahn (2005). "Radical S-adenosylmethionine enzyme coproporphyrinogen III oxidase HemN: functional features of the [4Fe-4S] cluster and the two bound S-adenosyl-L-methionines." The Journal of biological chemistry **280**(32): 29038-29046.
63. Layer, G., D. W. Heinz, D. Jahn und W. D. Schubert (2004). "Structure and function of radical SAM enzymes." Current opinion in chemical biology **8**(5): 468-476.
64. Layer, G., D. Jahn und M. Jahn (2010a). Heme Biosynthesis. Handbook of Porphyrin Science: Biochemistry of tetrapyrroles. K. M. Kadish, K. M. Smith und R. Guilard. Singapore, World Scientific. **15**: 191-193.
65. Layer, G., J. Moser, D. W. Heinz, D. Jahn und W. D. Schubert (2003). "Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes." The EMBO journal **22**(23): 6214-6224.
66. Layer, G., J. Reichelt, D. Jahn und D. W. Heinz (2010b). "Structure and function of enzymes in heme biosynthesis." Protein science : a publication of the Protein Society **19**(6): 1137-1161.
67. Layer, G., K. Verfurth, E. Mahlitz und D. Jahn (2002). "Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*." The Journal of biological chemistry **277**(37): 34136-34142.
68. Lee, D. S., E. Flachsova, M. Bodnarova, B. Demeler, P. Martasek und C. S. Raman (2005). "Structural basis of hereditary coproporphyria." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(40): 14232-14237.
69. Lermontova, I., E. Kruse, H. P. Mock und B. Grimm (1997). "Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(16): 8895-8900.
70. Lobo, S. A., A. D. Lawrence, C. V. Romao, M. J. Warren, M. Teixeira und L. M. Saraiva (2014). "Characterisation of *Desulfovibrio vulgaris* haem b synthase, a radical SAM family member." Biochimica et biophysica acta **1844**(7): 1238-1247.
71. Luo, J. und C. K. Lim (1993). "Order of uroporphyrinogen III decarboxylation on incubation of porphobilinogen and uroporphyrinogen III with erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase." The Biochemical journal **289** (Pt 2): 529-532.
72. Masoumi, A., I. U. Heinemann, M. Rohde, M. Koch, M. Jahn und D. Jahn (2008). "Complex formation between protoporphyrinogen IX oxidase and ferrochelatase during haem biosynthesis in *Thermosynechococcus elongatus*." Microbiology **154**(Pt 12): 3707-3714.
73. Miczak, A., I. Berek und G. Ivanovics (1976). "Mapping the uroporphyrinogen decarboxylase, coproporphyrinogen oxidase and ferrochelatase loci in *Bacillus subtilis*." Molecular & general genetics : MGG **146**(1): 85-87.
74. Miller, E. S., C. R. Woese und S. Brenner (1991). "Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. nov., sp. nov." International journal of systematic bacteriology **41**(3): 363-368.

75. Möbius, K., R. Arias-Cartin, D. Breckau, A. L. Hannig, K. Riedmann, R. Biedendieck, S. Schroder, D. Becher, A. Magalon, J. Moser, M. Jahn und D. Jahn (2010). "Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(23): 10436-10441.
76. Moser, J., W. D. Schubert, V. Beier, I. Bringemeier, D. Jahn und D. W. Heinz (2001). "V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis." *The EMBO journal* **20**(23): 6583-6590.
77. Narita, S., S. Taketani und H. Inokuchi (1999). "Oxidation of protoporphyrinogen IX in *Escherichia coli* is mediated by the aerobic coproporphyrinogen oxidase." *Molecular & general genetics : MGG* **261**(6): 1012-1020.
78. Nobelprize.org. (2013a, 10 Jun 2014). "Hans Fischer - Facts." from http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1930/fischer-facts.html.
79. Nobelprize.org. (2013b, 21 Jun 2014). "Richard Willstätter - Facts." from http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1915/willstatter-facts.html.
80. Olivier, M., D. J. Gregory und G. Forget (2005). "Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view." *Clinical microbiology reviews* **18**(2): 293-305.
81. Opperdoes, F. R. und P. A. M. Michels (2008). *The Metabolic Repertoire of Leishmania and Implications for Drug Discovery. Leishmania: After the Genome.* P. J. Myler und N. Fasel. Norfolk, Caister Academic. **1**: 123-158.
82. Panek, H. und M. R. O'Brian (2002). "A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis." *Microbiology* **148**(Pt 8): 2273-2282.
83. Parish, T., M. Schaeffer, G. Roberts und K. Duncan (2005). "HemZ is essential for heme biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." *Tuberculosis* **85**(3): 197-204.
84. Perutz, M. F. (1979). "Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron." *Annual review of biochemistry* **48**: 327-386.
85. Pham, N. K., J. Mouriz und P. E. Kima (2005). "*Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation." *Infection and immunity* **73**(12): 8322-8333.
86. Phillips, J. D., F. G. Whitby, C. A. Warby, P. Labbe, C. Yang, J. W. Pflugrath, J. D. Ferrara, H. Robinson, J. P. Kushner und C. P. Hill (2004). "Crystal structure of the oxygen-dependant coproporphyrinogen oxidase (Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of biological chemistry* **279**(37): 38960-38968.
87. Porra, R. J. und O. T. Jones (1963). "Studies on ferrochelatase. 1. Assay and properties of ferrochelatase from a pig-liver mitochondrial extract." *The Biochemical journal* **87**: 181-185.
88. Poulson, R. (1976). "The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria." *The Journal of biological chemistry* **251**(12): 3730-3733.
89. Poulson, R. und W. J. Polglase (1975). "The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase

- activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*." The Journal of biological chemistry **250**(4): 1269-1274.
90. **Pulvertaft, R. J. und G. F. Hoyle** (1960). "Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **54**: 191-196.
 91. **Righetti, P. G.** (1990). "Recent developments in electrophoretic methods." Journal of chromatography **516**(1): 3-22.
 92. **Rodgers, K. R.** (1999). "Heme-based sensors in biological systems." Current opinion in chemical biology **3**(2): 158-167.
 93. **Row, R.** (1912). "Leishmania Donovanii and Leishmania Tropica." British medical journal **1**(2674): 717-718.
 94. **Sah, J. F., H. Ito, B. K. Kolli, D. A. Peterson, S. Sassa und K. P. Chang** (2002). "Genetic rescue of Leishmania deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy." The Journal of biological chemistry **277**(17): 14902-14909.
 95. **Saha, S., R. Goswami, N. Pramanik, S. K. Guha, B. Saha, M. Rahman, S. Mallick, D. Modak, F. O. Silva, I. L. Mendonca, D. L. Costa, C. H. Costa und N. Ali** (2011). "Easy test for visceral Leishmaniasis and post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis." Emerging infectious diseases **17**(7): 1304-1306.
 96. **Sasarman, A., P. Chartrand, M. Lavoie, D. Tardif, R. Proschek und C. Lapointe** (1979). "Mapping of a new hem gene in *Escherichia coli* K12." Journal of general microbiology **113**(2): 297-303.
 97. **Schauer, S., C. Luer und J. Moser** (2003). "Large scale production of biologically active *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase from inclusion bodies." Protein expression and purification **31**(2): 271-275.
 98. **Schleyer, H., D. Y. Cooper und O. Rosenthal** (1972). "Preparation of the heme protein P-450 from the adrenal cortex and some of its properties." The Journal of biological chemistry **247**(19): 6103-6110.
 99. **Schobert, M. und H. Gorisch** (1999). "Cytochrome c550 is an essential component of the quinoprotein ethanol oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and sequencing of the genes encoding cytochrome c550 and an adjacent acetaldehyde dehydrogenase." Microbiology **145** (Pt 2): 471-481.
 100. **Schobert, M. und D. Jahn** (2002). "Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria." Journal of molecular microbiology and biotechnology **4**(3): 287-294.
 101. **Stamford, N. P., A. Capretta und A. R. Battersby** (1995). "Expression, purification and characterisation of the product from the *Bacillus subtilis* hemD gene, uroporphyrinogen III synthase." European journal of biochemistry / FEBS **231**(1): 236-241.
 102. **Storbeck, S., S. Saha, J. Krausze, B. U. Klink, D. W. Heinz und G. Layer** (2011). "Crystal structure of the heme d1 biosynthesis enzyme NirE in complex with its substrate reveals new insights into the catalytic mechanism of S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferases." The Journal of biological chemistry **286**(30): 26754-26767.
 103. **Taylor, R. T. und H. Weissbach** (1969). "*Escherichia coli* B N5-methyltetrahydrofolate-homocysteine cobalamin methyltransferase: activation with S-adenosyl-L-methionine and the mechanism for methyl group transfer." Archives of biochemistry and biophysics **129**(2): 745-766.

104. **Thauer, R. K. und L. G. Bonacker** (1994). "Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphinoid involved in methanogenesis." Ciba Foundation symposium **180**: 210-222; discussion 222-217.
105. **Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson** (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic acids research **22**(22): 4673-4680.
106. **Tripodi, K. E., S. M. Menendez Bravo und J. A. Cricco** (2011). "Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways." Enzyme research **2011**: 1-12.
107. **van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach und T. Laskay** (2004). "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages." Journal of immunology **173**(11): 6521-6525.
108. **Vega, J. M. und R. H. Garrett** (1975). "Siroheme: a prosthetic group of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase." The Journal of biological chemistry **250**(20): 7980-7989.
109. **Vetter, H., Jr. und J. Knappe** (1971). "Flavodoxin and ferredoxin of *Escherichia coli*." Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie **352**(3): 433-446.
110. **Vredenberg, W. J., J. Ames und L. N. Duysens** (1965). "Light-Induced Spectral Shifts in Bacteriochlorophyll and Carotenoid Absorption in Purple Bacteria." Biochemical and biophysical research communications **18**: 435-439.
111. **Warren, M. und A. Smith** (2009). Tetrapyrroles: Birth, Life and Death, Landes Bioscience.
112. **Warren, M. J. und P. M. Jordan** (1988). "Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase." Biochemistry **27**(25): 9020-9030.
113. **WHO** (2010). Control of the leishmaniasis - Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Geneva, World Health Organization: 1-5.
114. **Widboom, P. F., E. N. Fielding, Y. Liu und S. D. Bruner** (2007). "Structural basis for cofactor-independent dioxygenation in vancomycin biosynthesis." Nature **447**(7142): 342-345.
115. **Willetts, N.** (1980). "Interactions between the F conjugal transfer system and CloDF13::Tna plasmids." Molecular & general genetics : MGG **180**(1): 213-217.
116. **Xu, D. und Y. Zhang** (2012). "Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field." Proteins **80**(7): 1715-1735.
117. **Zuber, P., S. Chauhan, P. Pilaka, M. M. Nakano, S. Gurumoorthy, A. A. Lin, S. M. Barendt, B. K. Chi, H. Antelmann und U. Mader** (2011). "Phenotype enhancement screen of a regulatory *spx* mutant unveils a role for the *ytpQ* gene in the control of iron homeostasis." PloS one **6**(9): 1-11.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dieter Jahn, der mir die Möglichkeit gab unter seiner Leitung meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihm sehr für die Chance meine Arbeit auf verschiedenen internationalen Konferenzen zu präsentieren sowie für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft in den vergangenen Jahren.

P.D. Gunhild Layer danke ich zum einen dafür, dass sie sich als Zweitgutachterin meiner Dissertation zur Verfügung stellte und zum anderen für ihr Interesse an meiner Arbeit sowie die vielen Hilfestellungen in den letzten Jahren.

Prof. Ralf Mendel danke ich sehr für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Martina Jahn für ihre stete Hilfsbereitschaft und die familiäre Atmosphäre die sie stets verbreitet hat.

Prof. Harry Dailey danke ich für die Bereitstellung der *ypq* tragenden Plasmide.

Dem Labor 212 danke ich sehr für die schöne Arbeitsatmosphäre, den Rat und die vielen schönen Stunden. Besonders möchte ich hier auch Dr. Melanie Burghartz für ihre Unterstützung während meiner Masterarbeit, Dr. Simone Karrie für die Unterstützung während der gemeinsamen Zeit und Erstellung der *L. major hemG* Plasmide, sowie Mareike Berges danken, Arrow ohne dich ist einfach nicht das selbe ;).

Dem Institut für Mikrobiologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft danken. Hier im speziellen Louisa Roselius, welche mir in mathematischen und administrativen Fragen stets zur Seite stand.

Dagmar Rose und Barbara Cwiklinski danke ich für ihre unermüdliche Arbeit, ohne die ich so manches Mal kein Medium, keine Spitzen oder Kolben gehabt hätte. Bei euch war immer Sonnenschein.

Christina Nitzsche, Daniela Schnobel und Herrn Hoppe danke ich ganz herzlich für ihre immerwährende Unterstützung in allen finanziellen Fragen, sowie der Ausfüllung von jeglichen Formularen und natürlich für die vielen unterhaltsamen Gespräche.

Vera Haskamp danke ich dafür, dass sie mein Chaos stoisch ertragen hat, mir mit Rat zur Seite stand und mir morgens Tee ans Bett gebracht hat ;). Ohne dich wären die Konferenzen nur halb so schön gewesen.

Jenny Jacobs danke ich für die vielen schönen Gespräche und dafür, dass sie einfach sie ist.

Melanie Kühner danke ich für die schönen Stunden in diversen Restaurants, die ehrlichen Gespräche und ihre Hilfsbereitschaft.

Ariane und Frederick Khaledi danke ich dafür, dass sie seit Jahren an meiner Seite stehen und mir die Ehre erwiesen haben Trauzeugin ihrer Hochzeit zu sein. Ich danke euch beiden für unzählige Telefonate, Aufmunterungen, Kaffeesessions und so weiter.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ihr seid wohl der Hauptgrund dafür, dass diese Arbeit überhaupt entstanden ist, denn ihr habt mir die Stärke und das Vertrauen in mich selbst gegeben, um soweit in meinem Leben zu kommen. Danke dass ihr immer für mich da seid und mich unterstützt und vor allem dafür, dass ich immer weiß, dass ihr egal was passiert Stolz auf mich seid. Ich hab euch lieb.

Danke auch den wunderbaren Autoren Simon R. Green, Kim Harrison, Katie MacAlister, Jocelynn Drake, Carrie Vaughn, Karen Chance, Richard Kadrey, Jennifer Rardin, Patricia Briggs, Darynda Jones, Eileen Wilks, Gail Carriger, Sabrina Jeffries und Lindsay Sands für ihre humorvollen Romane, welche mich stets in eine andere Welt entführten und somit meinen Kopf frei machten.

Den Musikern und Musikgruppen Aloe Blacc, Alex Clare, American Steel, Aqualung, Christian Kane, Donots, The Faders, Gavin DeGraw, Gin Wigmore, Girls Aloud, Icona Pop, Itchy Poopzkid, KAtzenjammer, KT Tunstall, Life of Riley, Love and Theft,

New Radicals, Noisettes, Ryan Sheridan, Saint Lu, The pretty Reckless, Three Days Grace und Theory of a Deadman danke ich für ihre Musik zu der diese Arbeit entstanden ist.

Zu guter Letzt danke ich noch allen, die in den letzten 28 Jahren mein Leben auf die ein oder andere Weise begleitet und somit beeinflusst haben. Ohne sie wäre ich nicht der Mensch der ich heute bin, Danke.